

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Petra Kuchaříková

Ovlivnění glukózové tolerance metforminem v závislosti na obsahu tuku v dietě

Effect of metformin on glucose tolerance in relation to fat content in diet

Diplomová práce

Praha 2014

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Olga Horáková, PhD.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Oddělení biologie tukové tkáně

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Olgy Horákové, PhD. ve Fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. za použití dále uvedené literatury. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci ani žádnou její část nepoužila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.4.2013

.....

Petra Kuchaříková

Poděkování:

Děkuji své školitelce Mgr. Olze Horákové, PhD. za trpělivost, obětavost a odborné vedení, které mi věnovala během vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Janu Kopeckému, DrSc., vedoucímu Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR v.v.i., a všem členům laboratoře za pomoc, ochotu a přátelské prostředí. Děkuji Ing. Petře Janovské PhD. a Mgr. Janě Hansíkové za změření kinázové aktivity a hladiny inzulinu v rámci mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za pevné zázemí a podporu během studia.

Abstrakt

Prevalence obezity a doprovodných onemocnění jako je diabetes mellitus 2. typu se v poslední době prudce zvyšuje. Obezita a diabetes 2. typu spolu úzce souvisí. Obezita vede k rozvoji inzulínové rezistence, která je přímým předstupněm diabetu 2. typu. Metformin je lékem první volby u pacientů s diabetem 2. typu a prediabetiků. Působí příznivě na glukózovou homeostázu a zlepšuje inzulínovou rezistenci. V účinku metforminu se výrazně uplatňuje enzym AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK), která reguluje metabolismus v závislosti na energetickém stavu buňky. Recentní výsledky studií, kde byly použity transgenní modely, ale ukazují, že významný podíl účinku metforminu tvoří mechanismy na AMPK nezávislé. n-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA), které jsou přítomny v mořských rybách, působí příznivě na metabolismus. Tyto mastné kyseliny snižují hladinu lipidů v plazmě, působí protizánětlivě a u hlodavců dokážou zabránit rozvoji inzulínové rezistence a diabetu. Cílem této práce bylo charakterizovat akutní účinky metforminu na glukózovou toleranci, vliv krátkodobého podávání n-3 PUFA na účinek metforminu a role inulínem-stimulovaných signalizačních drah a AMPK. Výsledky prokázaly, že časný účinek metforminu na glukózovou homeostázu je výrazně závislý na dávce a že jednorázová vysoká dávka metforminu výrazně zlepšuje glukózovou toleranci už 60 minut po podání. Použití kombinace vysoké dávky metforminu s n-3 PUFA neprokázalo signifikantní aditivní efekt na glukózovou toleranci v porovnání se skupinou, které byl podán pouze metformin. Kombinace nízké dávky metforminu a n-3 PUFA ale signifikantně zlepšila glukózovou toleranci v porovnání s kontrolní skupinou. Akutní účinek metforminu na glukózovou homeostázu je nezávislý na přítomnosti $\alpha 2$ podjednotky AMPK a aktivace AMPK v játrech a kosterním svalu není v časném účinku metforminu zahrnuta. Stanovením aktivity protein-kinázy B (Akt/PKB), enzymu zodpovědného za inzulínovou citlivost, nebylo prokázáno zapojení inzulínové signalizace aktivací Akt/PKB v játrech a kosterním svalu.

Klíčová slova: metformin, inzulínová rezistence, n-3 PUFA, AMPK, glukózová tolerance.

Abstract

Prevalence of obesity and associated diseases like type 2 diabetes has increased rapidly during last years. These diseases closely relate to each other. Obesity leads to insulin resistance, which directly precedes type 2 diabetes. Metformin is the most prescribed medicament for type 2 diabetic patients and insulin resistant people. It improves glucose tolerance and insulin resistance. Enzyme AMP-activated protein kinase (AMPK) is strongly involved in metformin action. The latest studies using transgenic models lacking AMPK suggest, that notable part of mechanisms involved in metformin action is independent on AMPK. n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), namely eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are abundant in sea fish, have beneficial effects on metabolism. These fatty acids lower plasma lipids and exert cardioprotective effects. n-3 PUFA also prevent development of insulin resistance and type 2 diabetes in rodents. The aim of this thesis was to characterise acute effects of metformin on glucose homeostasis, impact of short term diet intervention with diet rich in n-3 PUFA on metformin action and the role of insulin stimulated signalling pathways and AMPK. Results suggest that early effect of metformin is dose dependent and that single dose of metformin significantly improves glucose tolerance 60 minutes after administration of the drug. Combination of high dose of metformin and n-3 PUFA did not exert significant additive improvement of glucose tolerance. However, low dose of metformin in combination with n-3 PUFA significantly improved glucose tolerance in comparison to control group. Next, acute metformin action is not dependent on presence of $\alpha 2$ subunit of AMPK and activation of AMPK in skeletal muscle and liver is not involved in acute metformin action. Measurement of the activity of protein kinase B (Akt/PKB), enzyme responsible for insulin sensitivity, did not reveal involvement of insulin stimulated signalling in liver or skeletal muscle.

Key words: metformin, insulin resistance, n-3 PUFA, AMP-activated protein kinase, glucose tolerance

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Literární přehled.....	11
2.1. Obezita	11
2.2. Tuková tkáň a její role v rozvoji inzulínové rezistence	12
2.2.1. Druhy obezity.....	13
2.2.2. Adipokiny.....	14
2.2.3. Zánět v tukové tkáni.....	14
2.3. Inzulínová rezistence.....	16
2.3.1. Účinky inzulínu na využití energetických substrátů	17
2.3.2. Inzulínová signalizace.....	17
2.3.3. AMP-aktivovaná protein kináza.....	18
2.3.4. Inzulínová rezistence v kosterním svalu	20
2.3.5. Inzulínová rezistence v játrech.....	24
2.3.6. Inzulínová rezistence v tukové tkáni.....	26
2.4. Diabetes.....	27
2.5. Metformin	31
2.5.1. Metformin a AMPK	33
2.5.2. Účinek metforminu v kosterním svalu	33
2.5.3. Účinek metforminu v játrech.....	34
2.5.4. Účinek metforminu na tukovou tkáň.....	38
2.6. n-3 polynenasycené mastné kyseliny	39
2.6.1. n-3 PUFA a kosterní sval	40
2.6.2. n-3 PUFA a játra	41
2.6.3. n-3 PUFA a tuková tkáň.....	43
3. Cíle diplomové práce	46
4. Metody	47
4.1. Materiál	47
4.1.1. Chemikálie	47
4.1.2. Přístroje a materiál	48
4.2. Experimentální diety.....	50

4.3. Práce s laboratorními zvířaty	53
4.4. Orální glukózový toleranční test (OGTT).....	54
4.5. Izolace proteinů.....	55
4.6. SDS-gelová elektroforéza	58
4.7. Western blot	60
4.8. Statistické vyhodnocení	63
5. Výsledky	64
5.1. Účinek vysoké dávky metforminu na glukózovou toleranci na pozadí diet HFD a HFD+F	64
5.1.1. Nárůst tělesné hmotnosti	64
5.1.2. Glukózový toleranční test	65
5.2. Účinek nízké dávky metforminu na glukózovou toleranci na pozadí diet HFD a HFD+F..	69
5.2.1. Nárůst tělesné hmotnosti	69
5.2.2. Spotřeba diety	70
5.2.3. Glukózový toleranční test	71
5.3. Účinek nízké dávky metforminu na glukózovou toleranci myši s celotělovým knockoutem	
$\alpha 2$ podjednotky AMPK	75
5.3.1. Nárůst tělesné hmotnosti	75
5.3.2. Glukózový toleranční test	76
5.4. Účinek vysoké dávky metforminu a n-3 PUFA na sekreci inzulínu po podání glukózy	79
5.5. Účinek vysoké dávky metforminu a n-3 PUFA na aktivitu AMPK v játrech a kosterním	
svalu	80
5.6. Účinek vysoké dávky metforminu a n-3 PUFA na aktivitu Akt/PKB v játrech a kosterním	
svalu	82
6. Diskuze.....	84
7. Závěr	92
8. Přehled literatury	93

Seznam zkratek

ACC	acetyl-CoA karboxyláza (Acetyl-CoA carboxylase)
ADP	adenosin difosfát
ALA	kyselina α -linolenová
AMP	adenosinmonofosfát
AMPD	AMP-deamináza
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
ATP	adenosintrifosfát
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
CAMKK	kalmulin dependentní protein kináza
cAMP	cyklické AMP
Cap	protein asociovaný s Cbl (Cbl asociated protein)
CBP	CREB vázající protein (CREB binding protein)
ChREBP	(carbohydrate response element binding protein)
CPT-1	karnitin palmitoyl transferáza 1
CREB	(cAMP response element-binding protein)
CRTC2	(CREB regulated transcription coactivator) 2
DAG	diacylglycerol
DHA	kyselina dokosaheptaenová
DPP-4	dipetidyl peptidáza 4
EPA	kyselina eikosaheptaenová
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
FAT/CD36	přenašeč mastných kyselin (fatty acid transporter)
FXR	(farnesoid x receptor)
GIP	glukózo-dependentní inzulínotropický peptid (glucose-dependent insulinotropic peptide)
GLP-1	glukagonu podobný peptid 1 (glucagon like peptide 1)
GLUT	glukózový přenašeč
HMG-CoA	3-hydroxy-3 metylglutaryl-CoA reduktáza
HNF4 α	(hepatocyte nuclear factor 4 α)
HSL	hormonsenzitivní lipáza
IKK	kináza inhibitoru κ B
IR	inzulínový receptor
IRS	substrát inzulínového receptoru (insulin receptor substrate)
JNK	c-Jun N terminální kináza
LCFA-CoA	aktivované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LKB-1	jaterní kináza B (liver kinase B)
LXR	(liver x receptor)
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza
MCP-1	(monocyte chemotactic protein 1)
MTP	(microsomal triglyceride transfer protein)

NFκB	jaderný faktor κB (nuclear factor κB)
OCT1	přenašeč organických kationtů 1 (organic cation transporter)
PDK1	fosfoinositid dependentní kináza 1
PGC-1α	PPARγ koaktivátor α (PPAR coactivator α)
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PIP3	fosfatidylinositol trisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKB/Akt	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PPAR	(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PUFA	polynenasycená mastná kyselina (polyunsaturated fatty acid)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SCD-1	stearoyl-CoA desaturáza 1 (stearoyl CoA desaturase 1)
SHP	(orphan nuclear receptor small heterodimer partner)
SREBP-1c	(sterol regulatory element binding protein)
TAG	triacylglycerol
TLR4	(Toll like receptor 4)
TNFα	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TZD	thiazolidindiony
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein)

1. Úvod

Obezita je charakterizována jako chronický stav, při kterém dochází k nadměrnému ukládání tuku v organismu. Výskyt obezity a diabetu 2. typu se v poslední době prudce zvyšuje a v některých zemích jejich výskyt již dosáhl stupně epidemie. K rozvoji obezity přispívá zásadním způsobem nadměrný kalorický příjem, nevhodná skladba jídelníčku a nedostatek pohybu. Svou roli hrají genetické předpoklady, ale i návyky získané v rodině. Neléčená obezita může vést k rozvoji inzulínové rezistence a následně diabetu 2. typu. Inzulínová rezistence je porucha citlivosti tkání k inzulínu. Liší se tak od diabetu 1. typu, jehož příčinou je porucha sekrece inzulínu z beta buněk pankreatu. Patogeneze diabetu 2. typu nespočívá v poruše sekrece inzulínu, ale v jeho sníženém účinku na cílové tkáni, rozvoji inzulínové rezistence. Obezita a diabetes 2. typu jsou součástí řady poruch, které se souhrnně nazývají metabolický syndrom. Sem mimo jiné patří i zvýšený krevní tlak a zvýšená hladina lipidů v plazmě. Jednou z komplikací metabolického syndromu je rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, které jsou dnes nejčastější příčinou úmrtí v České republice i ve světě. Také náklady na léčbu komplikací diabetu a poruch k němu přidružených tvoří významnou část rozpočtů zdravotnictví řady zemí, a proto se výzkumu patologie obezity, mechanismům vzniku diabetu a inzulínové rezistence dnes věnuje mnoho laboratoří po celém světě.

Pro léčbu diabetu 2. typu existuje mnoho preparátů. Nejčastěji předepisovaným lékem, který zlepšuje stav pacienta působením přímo na narušené mechanismy metabolismu je metformin. Pro mnoho lékařů představuje „lék první volby“ a je předepisován jak pacientům s diabetem 2. typu, tak lidem s některými příznaky inzulínové rezistence, jako prevence rozvoje diabetu. I přesto, že je používán už více jak 60 let, přesné mechanismy jeho účinků nejsou dosud známy.

Významně příznivě působí n-3 polynenasycené mastné kyseliny z mořských ryb. Tyto mastné kyseliny mají mnoho příznivých účinků na lidské zdraví, zejména na kardiovaskulární systém, ale i imunitu a centrální nervovou soustavu. Konzumace n-3 polynenasycených mastných kyselin snižuje hladinu triacylglycerolů v plazmě, výrazně

zlepšuje celkový metabolismus a zpomaluje nástup diabetu.

Cílem této diplomové práce byla charakterizace akutního účinku metforminu na utilizaci glukózy, působení n-3 polynenasycených mastných kyselin v podobě krátkodobé dietní intervence na účinek metforminu a role inzulinem-stimulovaných signalizačních drah a adenosinmonofosfátem-aktivované protein kinázy.

2. Literární přehled

2.1. Obezita

Obezita je stav, při kterém energetická rezerva organismu, která je uložena v tukové tkáni, stoupla nad obvyklou mez a má negativní účinky na zdraví organismu. Příčinou obezity je zejména nadměrný příjem energie, zvláště tuků a cukrů a nedostatek fyzické aktivity. K rozvoji obezity významně přispívají špatné stravovací návyky a životní styl. Jen minimální podíl případů obezity je zapříčiněn onemocněním, zejména genetickým.

Organismus zdravého jedince reaguje na pozitivní energetickou bilanci uložením přebytečné energie v tukové tkáni. Tato schopnost, která umožňuje vyrovnat se efektivně s nerovnoměrnou dostupností energie, ale předurčuje jedince se stálým přísunem nadbytku potravy k nabývání na váze a tloustnutí. Pokud příjem energie přesáhne kapacitu tukové tkáně ukládat přebytečnou energii v podobě triacylglycerolů (TAG), zvýší se hladina lipidů v plazmě a ty se začnou v podobě tzv. ektopického tuku ukládat i do periferních orgánů, jako jsou kosterní sval, játra a β -buňky. V periferních tkáních lipidy významně škodí a podílí se na vzniku inzulinové rezistence (Shulman, 2000).

Míru obezity lze vyjádřit pomocí takzvaného indexu tělesné hmotnosti (BMI). Tento index je vyjádřen podílem váhy a druhé mocniny výšky jedince ($BMI = \text{hmotnost}[\text{kg}] / \text{výška}^2[\text{m}]$). Hodnota indexu 25-29 odpovídá nadváze a hodnota vyšší než 30 obezitě (Haslam *et al.*, 2005). Ve státech Severní Ameriky a Evropy už teď obezita dosahuje epidemických proporcí a začíná se mluvit o celosvětové pandemii. V USA byl v roce 2008 podíl lidí s nadváhou a obezitou 70% (Ogden a Carroll, 2010) a v České

republiky se podle statistik s nadváhou a obezitou potýká celkem 55% populace (Ústav zdravotnických informací a statistiky, www.uzis.cz).

Obezita zvyšuje pravděpodobnost rozvoje různých chorob, zejména kardiovaskulárních onemocnění, diabetu 2. typu a hypertenze. Také způsobuje zvýšenou hladinu TAG a cholesterolu v plazmě. Tyto poruchy se souhrnně nazývají metabolický syndrom. Komplikace spojené s obezitou a metabolickým syndromem mají také ovlivňují délku života. Lidé s BMI v rozmezí 30-35 kg/m² se dožívají průměrně o 2-4 roky méně a lidé s BMI nad 40 kg/m² dokonce o 10 let (Whitlock *et al.*, 2009).

2.2. Tuková tkáň a její role v rozvoji inzulinové rezistence

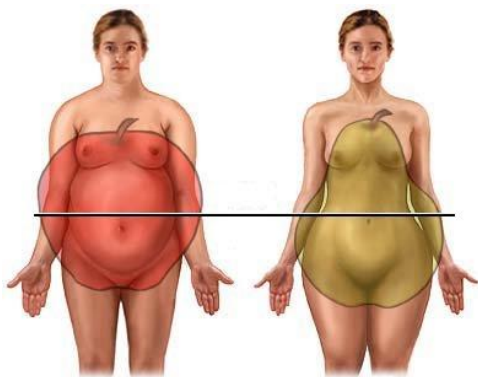
Tuková tkáň hraje v rozvoji inzulinové rezistence velmi významnou roli. Nejen, že se v ní ukládá energie přijatá v potravě, ale také produkuje množství adipokinů, hormonů tukové tkáně. Adipokiny řídí metabolismus orgánů jako jsou játra a kosterní sval, ale také ovlivňují příjem potravy. Abnormální produkce těchto cytokinů spolu s přítomností chronického zánětu v tukové tkáni se na rozvoji inzulinové rezistence významně podílí.

Velikost tukové tkáně je dána počtem i velikostí adipocytů. Zvětšování tukové tkáně probíhá buď zvyšováním počtu adipocytů (hyperplastický růst) nebo zvyšováním velikosti (hypertrofický růst). V raných fázích vývoje jedince převládá hyperplastický růst a v dospělosti hypertrofický růst tukové tkáně, který je důsledkem hromadění lipidů v buňce. Hyperplastický růst tukové tkáně může probíhat i v dospělosti a je spojen s obezitou a přibýváním na váze. Po dosažení kritické velikosti adipocytu v důsledku dlouhodobého hromadění lipidů je stimulována proliferace nových adipocytů z jejich prekurzorů a kromě růstu tukové tkáně zvětšováním buněk se zvyšuje i počet adipocytů (Jo *et al.*, 2010).

2.2.1. Druhy obezity

Podle toho, kde se tuk preferenčně ukládá je možné obezitu rozdělit na dva typy. Pokud se tuk ukládá v podkoží, zejména v okolí hýždí a stehen, jedná se o takzvanou periferní obezitu někdy nazývanou jako typ „hruška“. Tuk uložený v břišní dutině kolem vnitřních orgánů se nazývá centrální (viscerální) obezita (typ „jablko“);(obrázek 1). Typ obezity je určován pomocí obvodu pasu a poměru obvodu pasu a boků. Už v 50. letech 20. století prokázal francouzský lékař Jean Vague, že diabetes, dna a ateroskleróza jsou častěji diagnostikovány pacientům s centrální obezitou než těm, kteří mají tuk uložen v podkoží (Vague, 1956). Centrální obezita je také spojena s častějším výskytem glukózové intolerance, vysokou hladinou inzulínu, mastných kyselin a TAG v plazmě a dalšími složkami metabolického syndromu (Kissebah, 1982).

Viscerální tuková tkáň je napojena na portální krevní oběh, kterým je spojena s játry a může tak ovlivňovat jejich metabolismus. Viscerální tuková tkáň je metabolicky aktivnější, sekretuje tedy víc adipokinů a prozánětlivých cytokinů než periferní tuková tkáň. Hypertofické adipocyty jsou necitlivé k inzulínu, který inhibuje lipolýzu, a tak uvolňují více volných mastných kyselin, glycerolu a laktátu. Dostupnost lipidů je u jater jedním z hlavních faktorů určujících míru syntézy lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a glukoneogeneze, proto může být zvýšený tok metabolitů z tukové tkáně do jater zodpovědný za patogeneze spojené s viscerální obezitou (Montague a Rahilly, 2002).



Obr. 1: Centrální a periferní obezita

(web.volny.cz)

2.2.2. Adipokiny

Tuková tkáň funguje jako endokrinní orgán vylučující množství adipokinů. Jedním z nich je leptin, hormon produkovaný tukovou tkání, který ovlivňuje řízení příjmu potravy a ukládání energie. Podílí se na udržování energetické homeostázy a stimuluje výdej energie. Hladina leptinu v plazmě je přímo úměrná velikosti tukové tkáně, hormon tak signalizuje množství energetických zásob a tlumí příjem potravy. V periferních tkáních stimuluje zejména oxidaci mastných kyselin a v centrálním nervovém systému působí na centra sytosti a hladu (Hamman *et al.*, 1996). U obézních lidí je hladina leptinu vysoká, ale tělo na něj nereaguje dostatečně. Tento stav je nazýván leptinovou rezistencí. Leptinová rezistence se projevuje nadměrným příjmem potravy, ukládáním tuku a snížením kalorického výdeje. Jak již bylo zmíněno, za normálních okolností leptin v periferních tkáních stimuluje oxidaci mastných kyselin. Pokud je buňka k leptinu rezistentní, tuk se v periferních orgánech nespálí, ale ukládá v podobě ektopického tuku (Shimabukuro *et al.*, 1997).

Dalším významným hormonem ovlivňujícím metabolismus je adiponektin. Tento hormon má antidiabetické účinky. Hladina adiponektinu v plazmě je nepřímo úměrná množství tuku v těle, BMI a míře inzulínové rezistence. Adiponektin působí zejména v kosterním svalu a játrech. Zde stimuluje oxidaci mastných kyselin, vstup glukózy do buněk a inhibuje glukoneogenezi. Tím zlepšuje inzulínovou citlivost a působí proti ukládání ektopického tuku v těchto tkáních. Na rozdíl od leptinu má adiponektin menší vliv na příjem potravy a tělesnou hmotnost (Yamauchi *et al.*, 2002).

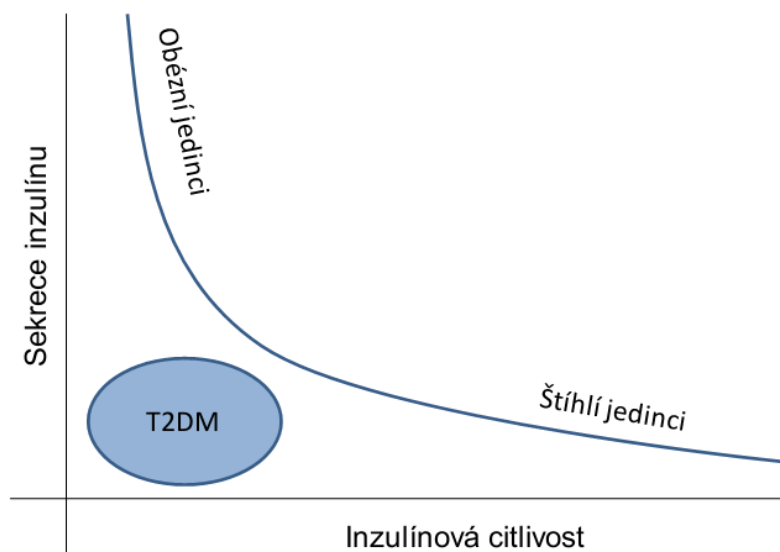
2.2.3. Zánět v tukové tkáni

Obezita a inzulinová rezistence je kromě nadměrného ukládání tuků spojena také se stavem systémového chronického zánětu. Zánětlivá reakce je v tradičním pojetí odpovědí organismu na poranění nebo infekci a zahrnuje projevy jako jsou otok, zarudnutí, bolest a zvýšení teploty. Krátkodobý zánět je nutnou součástí obnovy poškozené tkáně. Dlouhodobé důsledky zánětlivého stavu jsou pro organismus škodlivé a účastní se patogeneze metabolických chorob. Podobně jako krátkodobá zánětlivá reakce je důsledkem náhlého narušení homeostázy organismu, chronický zánět může být důsledkem dlouhodobé nerovnováhy, jako je nadváha a obezita. Chronický zánět je charakteristický abnormální produkcí cytokinů a aktivací zánětlivé signalizace ve tkáních (Wellen a Hotamisligil, 2005). Zdá se, že rostoucí adipocyty produkují chemotaktické signály vedoucí ke zvýšené infiltraci makrofágů do tukové tkáně (Weisberg *et al.*, 2003). Tyto makrofágy pak sekretují prozánětlivé cytokiny z tukové tkáně. Klíčovým místem produkce prozánětlivých cytokinů je viscerální tuková tkáň. V tukové tkáni obézních hlodavců, ale i lidí, byla prokázána zvýšená exprese tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) a interleukinu-6 (IL-6), a tím byl prokázán jasný vztah mezi obezitou, diabetem a chronickým zánětem (Hotamisligil *et al.*, 1993); (Saghizadeh *et al.*, 1996). TNF- α je prozánětlivý cytokin, který aktivuje v buňce nejrozumnější signální dráhy, z nichž některé jsou považovány za inhibiční pro inzulinovou signalizaci. V myších modelech obezity je nedostatek TNF- α doprovázen zlepšením inzulinové rezistence a pokud je TNF- α podán orálně, je schopen navodit inzulinovou rezistenci (Hotamisligil *et al.*, 1995).

2.3. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence je definována jako stav, kdy tkáň není schopna adekvátně reagovat na normální hladiny inzulínu v plazmě a hormon vyvolá menší biologický účinek. Necitlivost k inzulínu je klíčovým elementem v patogenezi metabolického syndromu a hraje zásadní roli v rozvoji diabetu 2. typu.

Inzulín je hormon zodpovědný za udržování stálé hladiny glukózy v plazmě a to prostřednictvím vyvážené souhry mezi sekrecí hormonu a jeho účinkem. Inzulín stimuluje vstup glukózy do buněk a lipogenezi a inhibuje glukoneogenezi v játrech. V důsledku narušení inzulínové signalizace lipidovými metabolity a prozánětlivými cytokiny nejsou buňky schopny glukózu dostatečně využít a inhibovat glukoneogenezi. Hladina glukózy v krvi narůstá a na hyperglykémii organismus odpovídá zvýšením sekrece inzulínu z β -buněk (obrázek 2). Dlouhodobé vysoké hladiny glukózy se pak podílí na poškození β -buněk a rezistence se dále rozvíjí až do stavu, který je definován jako diabetes 2. typu (Samuel a Shulman, 2012).



Obr. 2: Vztah mezi inzulínovou citlivostí a sekrecí inzulínu

(přepřacováno z Stumvoll *et al.* 2005). T2DM – Diabetes mellitus 2. typu

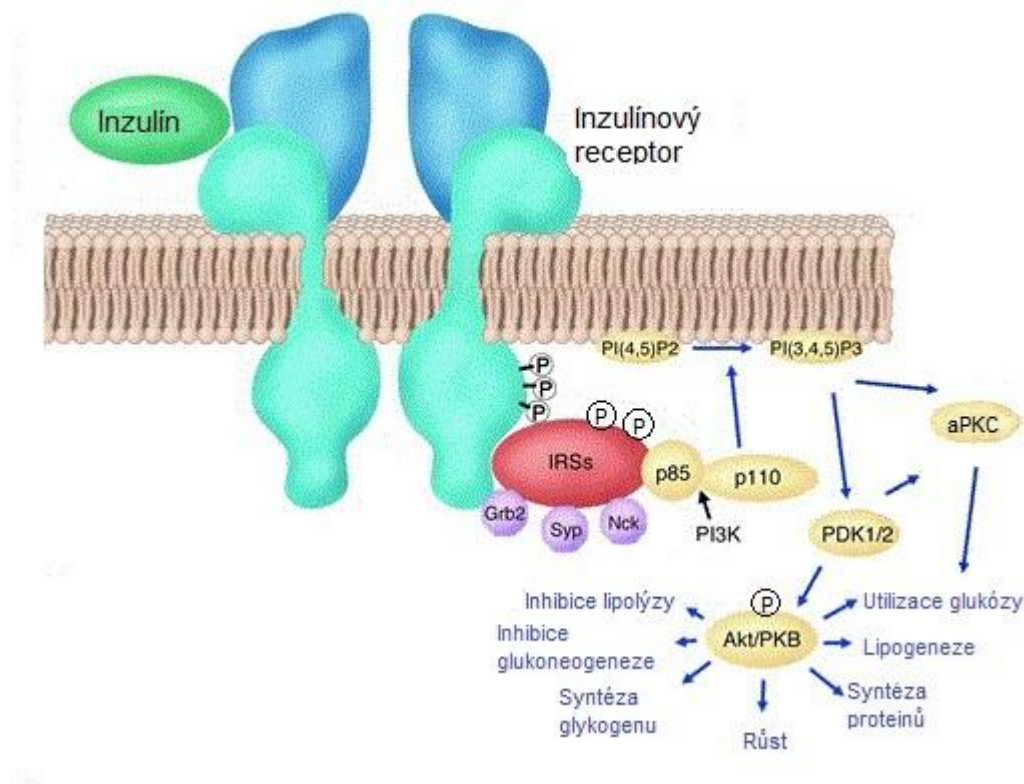
2.3.1. Účinky inzulínu na využití energetických substrátů

Při hladovění je glukóza produkovaná játry vyhrazena pro orgány, které jsou závislé na glukóze, jako je např. mozek. Další orgány, jako např. kosterní sval, použijí jako energetický substrát volné mastné kyseliny uvolněné tukovou tkání (Frayn, 2002). Zvýšená dostupnost mastných kyselin v plazmě vede ke zvýšení β -oxidace a inhibici glykolytické dráhy. Nahromadění glukóza-6-fosfátu inhibuje hexokinázu a zvýšení hladiny glukózy v cytoplazmě následně inhibuje vstup glukózy do buněk. Po inzulínové stimulaci je lipolýza v tukové tkáni inhibována, a mastné kyseliny z potravy nasměrovány do tukové tkáně. Inzulín stimuluje vstup glukózy do buněk a glukóza je použita jako energetický substrát (Corpeleijn *et al.*, 2009).

2.3.2. Inzulínová signalizace

Inzulínová signalizace ve zdravé tkáni je zahájena vazbou inzulínu na inzulínový receptor (IR) na plazmatické membráně. Po vazbě hormonu se změní konformace receptoru a ten se autofosforyluje na specifických tyrosinech. Tato konformační změna umožní vazbu substrátu inzulínového receptoru (IRS) a jeho fosforylaci na specifických tyrosinech. IRS obsahuje specifické tyrosiny a seriny, jejichž fosforylace moduluje přenos signálu. Fosforylace na tyrosinech jsou aktivační, naproti tomu fosforylace na serinech působí na signalizaci inhibičně. Aktivovaný IRS váže proteiny obsahující SH2 doménu, mezi nimi p85 regulační podjednotku fosfatidylinositol 3 kinázy (PI3K) (Gual *et al.*, 2005). Tato lipidová kináza katalyzuje vznik fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu (PIP3). PIP3 funguje v buňce jako signální molekula a mimo jiné aktivuje fosfoinositid-dependentní kinázu 1 (PDK1). Tato kináza pak aktivuje další členy inzulínové signální kaskády, protein kinázu C (PKC) a protein kinázu B (Akt/PKB) (Chou *et al.*, 1998); (Alessi *et al.*, 1997). Tyto kinázy regulují množství procesů, např. translokaci váčků s glukózovými přenašeči 4 (GLUT 4) na plazmatickou membránu, syntézu glykogenu nebo translaci mRNA a syntézu proteinů. Inzulín prostřednictvím této signalizace také stimuluje vazodilataci, podporuje růst a proliferaci, inhibuje lipolýzu a reguluje řadu dalších procesů (obrázek 3); (Lawlor a

Alessi, 2001). Ve stavu inzulínové rezistence je tato signalizace narušena na několika místech a efektivita přenosu signálu je snížena. Detailní mechanismy narušení této signalizace jsou uvedeny níže (Kapitoly 2.3.4, 2.3.5. a 2.3.6.).



Obr. 3: Přenos inzulínového signálu

(přepřacováno dle van den Berghe, 2004)

2.3.3. AMP-aktivovaná protein kináza

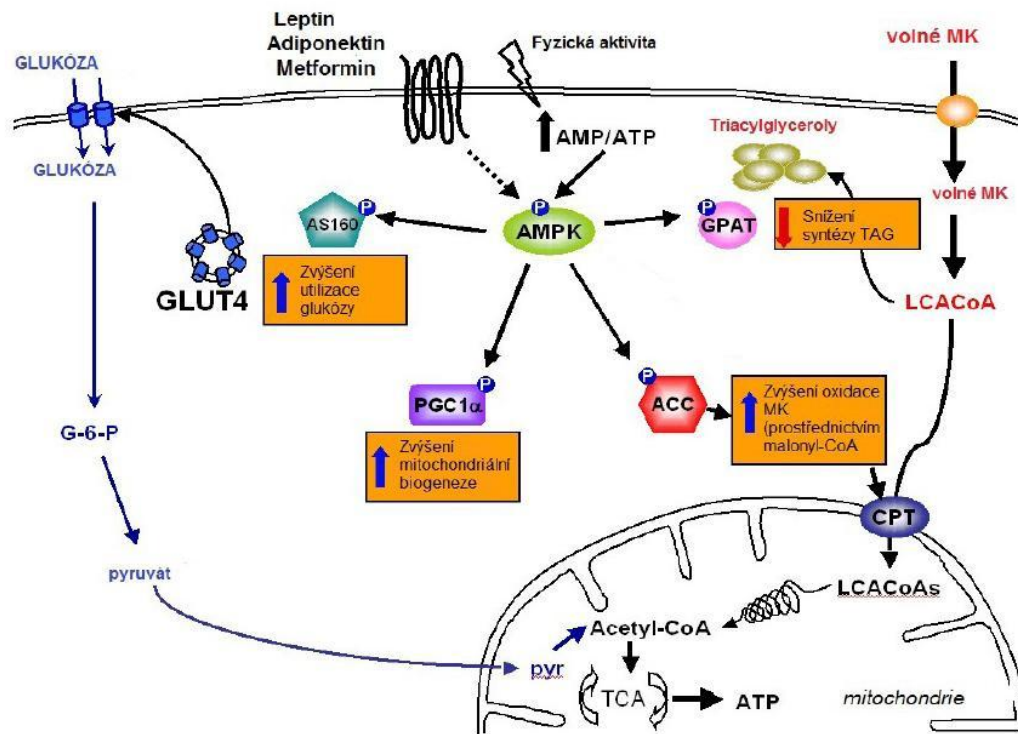
Adenosin monofosfátem aktivovaná protein-kináza (AMPK) je enzym, který funguje jako energetický senzor buňky. Je aktivována adenosin monofosfátem (AMP), produktem hydrolýzy adenosin trifosfátu (ATP). V případě zvýšení hladiny AMP v buňce AMPK spouští v buňce katabolické dráhy zahrnující β -oxidaci mastných kyselin a utilizaci

glukózy a inhibuje dráhy anabolické (glukoneogenezi a lipogenezi).

AMPK je heterotrimerický protein, který se skládá z jedné katalytické α podjednotky a dvou regulačních podjednotek β a γ . Aktivace AMPK zahrnuje vazbu AMP na regulační podjednotku γ a následnou konformační změnu, která zabraňuje defosforylaci. Pro plnou aktivaci AMPK musí být enzym fosforylován na Thr¹⁷² α podjednotky. Tuto fosforylaci zprostředkovávají jaterní kináza B (LKB 1) a kináza kalmodulin dependentní protein kinázy β (CaMKK β). Aktivace AMPK je stimulována fyzickou aktivitou, hypoxií, metforminem, adiponektinem a leptinem.

AMPK snižuje lipogenezi a zvyšuje oxidaci mastných kyselin v mitochondriích. Prostřednictvím stimulace transkripčního faktoru PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α) AMPK zvyšuje expresi genů mitochondriální biogeneze a oxidace mastných kyselin. V kosterním svalu zvyšuje vstup glukózy do buněk glukózovými přenašeči GLUT 4 působením na protein AS160, který se na regulaci translokace váčků s GLUT 4 významně podílí. V tukové tkáni tato kináza tlumí lipogenezi (Viollet *et al.*, 2009);(obrázek 4).

AMPK zvyšuje oxidaci mastných kyselin v mitochondriích působením na acetyl-CoA karboxylázu (ACC), enzym kontrolující syntézu malonyl-CoA, jehož hladina určuje míru vstupu mastných kyselin do mitochondrie a jejich následnou oxidaci. AMPK tento enzym fosforyluje a inhibuje (Zhou *et al.*, 2001). Malonyl Co-A je inhibitorem přenašeče mastných kyselin karnitin palmitoyl transferázy 1 (CPT 1). CPT 1 se nachází na vnější membráně mitochondrií a zprostředkuje vstup mastných kyselin do mitochondrií, kde jsou mastné kyseliny následně oxidovány. Snížením hladiny malonyl Co-A působením AMPK dojde k deinhibici CPT 1 a je umožněna zvýšená oxidace mastných kyselin (McGarry; Brown., 1997). AMPK také navíc snižuje expresi lipogenních genů, jako jsou syntáza mastných kyselin (FAS) a ACC a to přímou fosforylací jejich transkripčních faktorů (Foretz *et al.*, 1998).



Obr. 4: Účinky AMPK na metabolismus buňky

(přepřacováno z Kraegen *et al.*, 2009)

2.3.4. Inzulínová rezistence v kosterním svalu

Tkáň, která se hlavní měrou podílí na vychytávání glukózy z krevního řečiště je kosterní sval. Po jídle se zvýší hladina glukózy v plazmě vedoucí k sekreci inzulínu a ten stimuluje vstup glukózy do buněk. Kosterní svalstvo utilizuje postprandiálně až 80% veškeré glukózy z plazmy a proto je schopnost této tkáně reagovat na inzulínovou signalizaci důležitou součástí glukózového metabolismu organismu (DeFronzo a Tripathy, 2009).

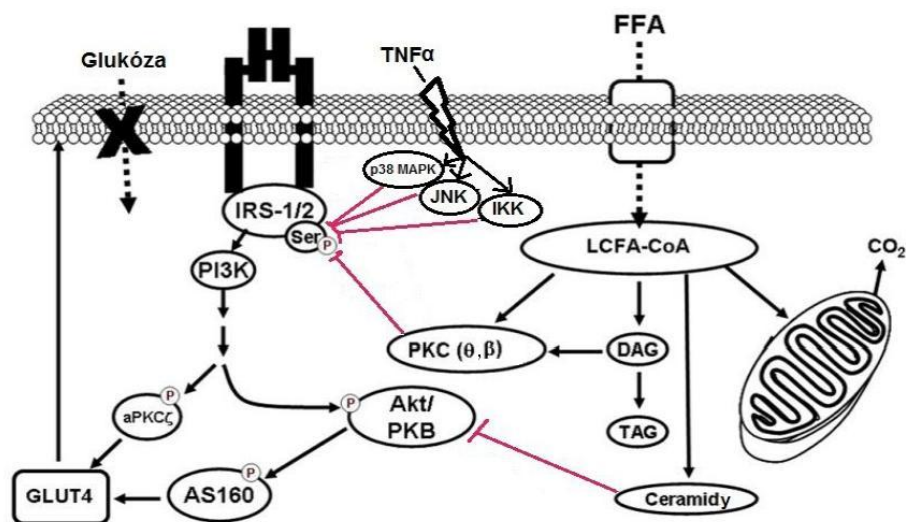
Inzulínová citlivost je nepřímo úměrná množství lipidů v myocytu. Na rozvoji inzulínové rezistence se významně podílí hromadění lipidových metabolitů v myocytech a také vliv prozánětlivých cytokinů. Další studie prokázaly mitochondriální poruchy. Je možné, že ty také přispívají k hromadění lipidových metabolitů. Jak bylo popsáno výše, obézní jedinci mají v důsledku neodstatečné inhibice lipolýzy v tukové tkáni zvýšené hladiny volných mastných kyselin v plazmě po inzulínové stimulaci. U obézních pacientů a nemocných diabetem 2. typu byl pozorován zvýšený transport mastných kyselin do buněk kosterního svalu. Na vyšší dostupnost mastných kyselin v plazmě buňka zřejmě odpovídá zvýšenou expresí přenašečů mastných kyselin (Simoneau *et al.*, 1999). Naopak kapacita mitochondrií oxidovat mastné kyseliny je u obézních inzulín-rezistentních jedinců zhoršená (Petersen *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že aktivita řady mitochondriálních enzymů podílejících se na degradaci mastných kyselin v myocytu je u obézních inzulín-rezistentních pacientů snížena (Simoneau *et al.*, 1999), (Kim *et al.*, 2000). Kromě snížené aktivity klíčových enzymů byly u mitochondrií prokázány také změny v jejich velikosti. Mitochondrie obézních lidí a diabetiků jsou až o 35% menší než mitochondrie štíhlých dobrovolníků a vykazují odlišnou morfologii. Jejich velikost také koreluje s inzulínovou citlivostí kosterního svalu (Kelley *et al.*, 2002). U diabetiků byly také prokázány zvýšené hladiny malonyl-CoA, molekuly regulující míru vstupu mastných kyselin do mitochondrie a jejich následnou oxidaci (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Vyšší míra vstupu mastných kyselin do buňky bez adekvátního zvýšení oxidace mastných kyselin vede k hromadění lipidů a lipidových meziproduktů v cytoplazmě. Je důležité, jakého charakteru intramyocelulární lipidy jsou. TAG jsou metabolicky celkem inertní látky, a jejich množství inzulínovou rezistenci příliš dobře neodráží. Vysoké hladiny TAG ve svalech mají i trénovaní sportovci velmi citliví k inzulínu. Mnohem spolehlivějším ukazatelem zhoršené inzulínové citlivosti jsou meziprodukty lipidového metabolismu. Jedná se hlavně o ceramidy, diacylglycerol (DAG) a aktivované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA-CoA) (Consitt *et al.*, 2009). Ceramidy ruší inzulínovou signalizaci a to prostřednictvím inhibice přenosu signálu přes Akt/PKB. V myocytech se zvýšeným obsahem ceramidů byla po inzulínové stimulaci pozorována snížená fosforylace Akt/PKB

na Ser⁴⁷³, zbytku důležitém pro plnou aktivaci Akt/PKB (Adams *et al.*, 2004). V kosterních svalech diabetiků 2. typu byla po inzulínové stimulaci snížena také fosforylace Akt/PKB na Thr³⁰⁸, která je klíčová pro přenos inzulínového signálu (Karlsson *et al.*, 2005). Zablokování syntézy ceramidů vedlo k obnovení signalizace přes Akt/PKB, což je v souladu s teorií, že ceramidy působí inhibičně právě na Akt/PKB. Ceramidy vznikají hydrolýzou sfingomyelinu nebo syntézou *de novo* z nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Míra syntézy ceramidů je určena dostupností mastných kyselin, množství ceramidu v myocyty tak přímo koreluje s hladinou volných mastných kyselin v plazmě. Zvýšený obsah ceramidu až o 100% byl potvrzen v myocytech inzulín-rezistentních i obézních lidí (Holland *et al.*, 2007).

DAG je meziproduktem metabolismu fosfolipidů a TAG. V buněčné signalizaci funguje jako „druhý posel“. Jejich působení je spjato se zhoršením inzulínové signalizace. Množství experimentů potvrdilo, že se zvýšenou hladinou DAG v myocyty je spojena i aktivace izoformy θ protein kinázy C (PKC θ). PKC θ je serinová kináza, která fosforyluje IRS-1 na Ser³⁰⁷. Serinová fosforylace IRS inhibuje inzulínovou signalizaci a znemožní další přenos signálu. V důsledku serinové fosforylace IRS bylo prokázáno 30% snížení tyrosinové fosforylace IRS a 50% snížení aktivity PI3K (Yu *et al.*, 2002). U diabetických pacientů byla prokázána zvýšená hladina i aktivita PKC θ v porovnání s nediabetickými jedinci (Itani *et al.*, 2001). Tyto poznatky potvrzují významnou úlohu, jakou reaktivní meziprodukty lipidového metabolismu hrají v rozvoji inzulínové rezistence.

LCFA-CoA jsou metabolicky aktivní formou mastných kyselin. Zvýšená hladina LCFA-CoA spojená s inzulínovou rezistencí byla zjištěna v kosterním svalu lidí i hlodavců konzumujících dietu s vysokým obsahem tuku (Ellis *et al.*, 2000). Není jasné, jak přesně LCFA-CoA ovlivňují inzulínovou signalizaci. Potenciální mechanismus mohou naznačovat zvýšené hladiny LCFA-CoA v myocytech zároveň s aktivací izoform PKC (Yu *et al.*, 2002). LCFA-CoA jsou prekurzory ceramidů i DAG, a tak je možné, že na inzulínovou signalizaci působí nepřímo (obrázek 5).

Prozánětlivé cytokiny sekretované tukovou tkání také velmi významně působí na inzulínovou signalizaci. U obézních jedinců jsou hladiny TNF α významně zvýšeny. Infuze TNF α zhoršila uptake glukózy v kosterních svazech potkanů *in vivo* (Zhang *et al.*, 2003) i *in vitro*. TNF α také aktivuje serin/threoninové kinázy, které se na narušení inzulínové signalizace také mohou podílet. Působením TNF α *in vitro* došlo v myocytech k aktivaci p38 mitogeny aktivované protein kinázy (p38 MAPK), c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a kinázy inhibitoru κ B (IKK). Tyto kinázy mohou fosforylovat Ser³⁰⁷ na IRS-1 a snížit tak efektivitu přenosu inzulínového signálu (de Alvaro *et al.*, 2004).



Obr.5 Mechanizmy narušení inzulínové signalizace lipidovými metabolity a zánětlivými cytokiny v kosterním svalu
(přepřacováno z Consitt *et al.*, 2009)

2.3.5. Inzulínová rezistence v játrech

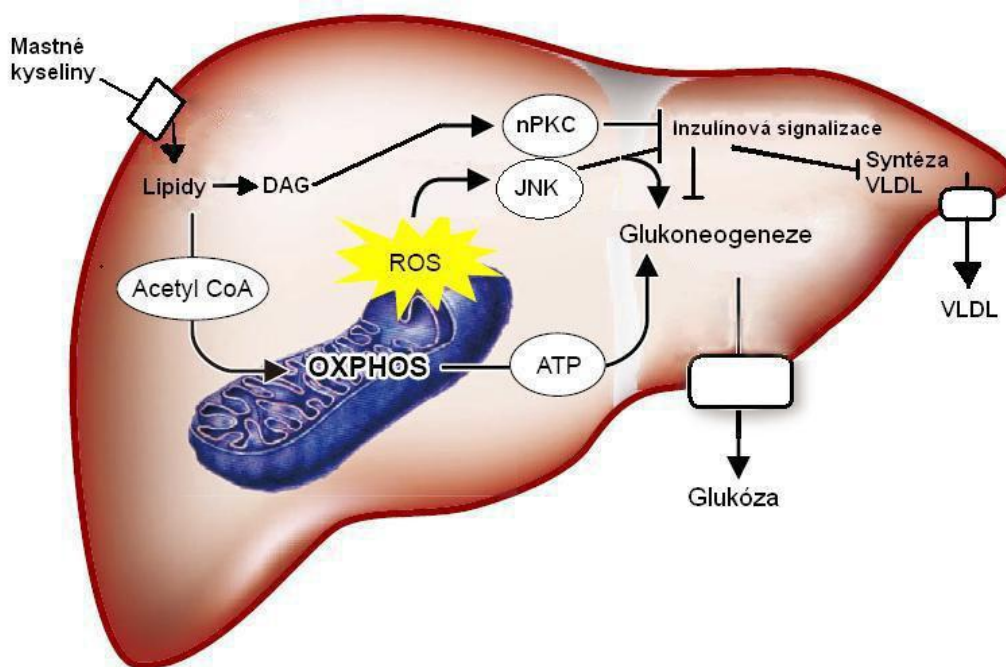
Játra jsou orgánem zodpovědným za kontrolu energetické homeostázy organismu. Přes portální žílu jsou přímo propojena s viscerální tukovou tkání a jsou vystavena množství cytokinů, biologicky aktivních látek a lipidů, sekretovaných touto tkání. V játrech inzulin stimuluje syntézu glykogenu a inhibuje glukoneogenezi. Neschopnost jater reagovat adekvátně na inzulin a inhibovat glukoneogenezi přímo předchází rozvoji inzulínové rezistence ve svalu a následně diabetu. S jaterní inzulínovou rezistencí je úzce spojeno také ukládání ektopického tuku v játrech (steatóza);(Takamura *et al.*, 2008).

Inzulínová rezistence v játrech je stejně jako v kosterním svalu navozena hromaděním lipidových metabolitů jako jsou ceramidy a DAG. V inzulín-rezistentních játrech inzulin nedostatečně inhibuje lipolýzu. Ta stále probíhá a přispívá ke zvýšenému příjmu mastných kyselin do hepatocytů. Zvýšený vstup mastných kyselin a zhoršená kapacita je oxidovat vede ke zvýšení hladiny zejména diacylglycerolu v cytoplazmě. Přenašeč mastných kyselin přes cytoplazmatickou membránu FAT/CD36 je ve zdravých játrech exprimován jen málo, v játrech obézního jedince je ale jeho exprese zvýšená a přímo koreluje s obsahem TAG v játrech (Greco *et al.*, 2008). Inzulín stimuluje v játrech *de novo* lipogenezi a to i pokud jsou k inzulinu rezistentní. Transkripční faktor SREBP-1c ovlivňující expresi lipogenních genů, je v inzulín-rezistentních hepatocytech vysoce upregulován a přispívá tak k hromaděním lipidů a jejich metabolitů (Shimomura *et al.*, 1999). V důsledku zvýšení množství DAG v cytoplazmě je aktivována atypická PKC izoformy ϵ . Ta se váže na inzulínový receptor a inhibuje jeho tyrosin-kinázovou aktivitu. Přímo tak inhibuje přenos inzulínového signálu (Samuel *et al.*, 2007).

Rozvoj inzulínové rezistence v játrech je úzce spjat s vysokou hladinou reaktivních kyslíkových radikálů (obrázek 6). V důsledku zvýšené dodávky substrátu do mitochondrií dojde ke zvýšení exprese enzymů respiračního řetězce, narozdíl od kosterního svalu, kde byla exprese těchto enzymů snížena (Takamura *et al.*, 2008). Mitochondriální respirační řetězec je kromě tvorby ATP také zdrojem reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Elektrony, které jím prochází, mohou uniknout z dráhy a přímo redukovat molekuly

kyslíku. Zvýšená dodávka substrátu tak vede ke zvýšené tvorbě ROS. Zvýšená hladina ROS aktivuje stresem indukovanou kinázu JNK. Tato kináza pak ruší inzulinovou signalizaci prostřednictvím fosforylace IRS na serinu a spouští glukoneogenezi. Pro takto spuštěnou glukoneogenezi jsou jako substráty použity meziprodukty citrátového cyklu, získané z glykolýzy. Inzulín tak není schopen inhibovat glukoneogenezi, ale stále aktivuje lipogenezi (Nakamura *et al.*, 2009).

Export lipidů z jater probíhá formou sekrece částic VLDL. Inzulín ve zdravých játrech snižuje sekreci VLDL partikulí inhibicí transkripce MTP (microsomal triglyceride transfer protein), proteinu nutného pro dokončení syntézy lipoproteinové částice. Při inzulinové rezistenci je signalizace vedoucí k inhibici exprese proteinu MTP narušena a v důsledku toho je export VLDL trvale zvýšený. I přes zvýšený export TAG z jater buňky nestačí kompenzovat jejich zvýšenou syntézu a tento mechanismus také přispívá k hromadění lipidů v játrech a rozvoji steatózy (Choi *et al.*, 2011).



Obr. 6: Inzulínová rezistence v játrech

(přepřacováno dle Takamura *et al.*, 2012)

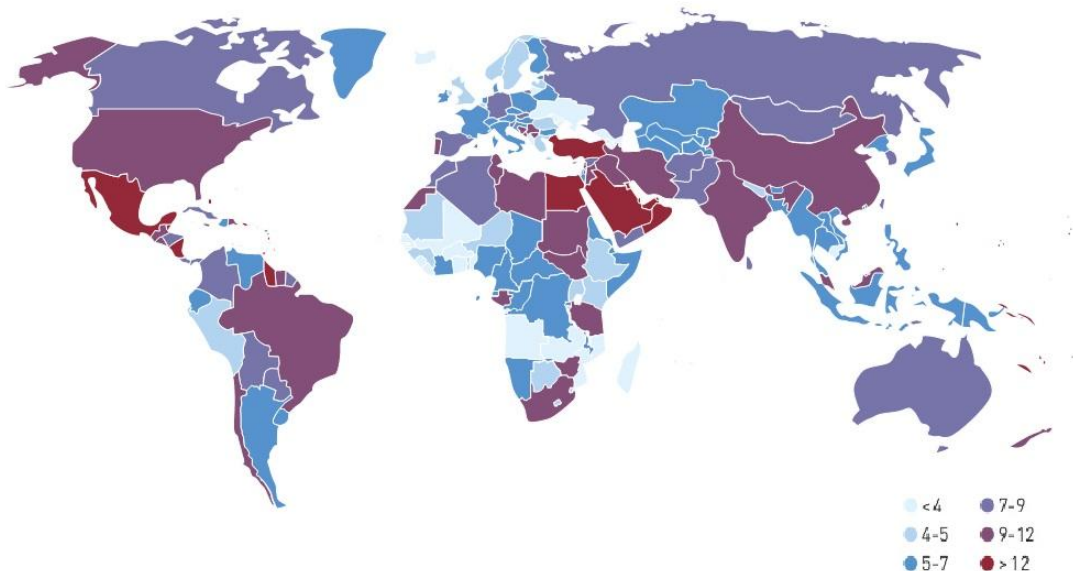
2.3.6. Inzulínová rezistence v tukové tkáni

V průběhu hladovění využívají tkáně jako energetický substrát mastné kyseliny. Ty jsou uvolňovány tukovou tkání po stimulaci glukagonem a adrenalinem prostřednictvím hormon sensitive lipázy (HSL). Postprandiálně je HSL v adipocytech rychle inhibována inzulínem (Strålfors *et al.*, 1989) a je stimulována *de novo* lipogeneze (Haystead *et al.*, 1986). Sníží se tak míra lipolýzy a následně hladina volných mastných kyselin v plazmě. V inzulín-rezistentních adipocytech není lipolýza inzulínem efektivně inhibována v důsledku narušení inzulínové signalizace a *de novo* lipogeneze je také inhibována. Zvýší se tak hladiny volných mastných kyselin v plazmě. V tukové tkáni obézních jedinců je zvýšena produkce ROS a oxidativní stres. Ten přímo předchází zvýšení hladin TNF α v plazmě (Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008). Také bylo prokázáno, že TNF α zvyšuje aktivitu HSL v adipocytech. To také přispívá ke zvýšeným hladinám volných mastných kyselin a jejich ukládání v podobě ektopického tuku v periferních orgánech (Green *et al.*, 1994).

2.4. Diabetes

Diabetes je onemocnění, které se projevuje vysokou hladinou cukru v krvi. Příčinou tohoto stavu může být nedostatečná produkce inzulínu pankreatem nebo neschopnost tkání na inzulín reagovat. Prevalence diabetu 2. typu celosvětově prudce narůstá a v některých zemích jím trpí více než 12% dospělé populace (obrázek 7).

Diabetes 1. typu je autoimunitní nemoc, která nebývá spojena s obezitou. Rozvine se u pacientů s genetickou predispozicí. V důsledku neadekvátní imunitní reakce jsou zničeny β -buňky pankreatu a už nejsou dále schopné sekretovat inzulín. U pacientů s T1DM je jedinou možností léčby inzulínová substituce a z celkového počtu diabetiků tvoří pouze 10%. Příčinou vzniku diabetu 2. typu není dysfunkce β -buněk tu jako u diabetu 1. typu, ale rozvoj inzulínové rezistence. Přímý vztah mezi inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu byl prokázán a přispěla k němu tato pozorování: a) u pacientů s diabetem 2. typu se vždy vyskytuje inzulínová rezistence; b) potomci diabetiků 2. typu jsou také rezistentní k inzulínu; c) inzulínová rezistence je spolehlivým markerem budoucího rozvoje diabetu; d) diabetu se dá předcházet užíváním přípravků zvyšujících inzulínovou citlivost (Savage *et al.*, 2007). Při pokročilejší inzulínové rezistenci zvýšená sekrece inzulínu nestačí kompenzovat poruchy v inzulínové signalizaci a hladina glukózy se zvyšuje. Diabetes mellitus 2. typu je diagnostikován na základě parametrů glukózové tolerance, jako hladina glukózy nalačno a po podání dávky glukózy nebo hladina glykovaného hemoglobinu. Dlouhodobě vysoké koncentrace glukózy v krvi β -buňky poškodí, ty už nejsou dále schopny sekretovat inzulín a dále přispívají k patofyziologii diabetu. U diabetiků se rozvíjí hyperglykémie postprandiálně, kdy inzulín není schopen stimulovat vstup glukózy do buněk, ale také nalačno, kdy nedochází k dostatečné inhibici glukoneogeneze v játrech. Komplikace diabetu 2. typu jsou zejména dislipidémie, vysoký krevní tlak, poškození ledvin a očí, neurologické komplikace a atherogeneze. Největší riziko představují pro diabetiky zejména kardiovaskulární onemocnění, která se rozvíjí právě důsledkem atherogeneze (Stumvoll *et al.*, 2005).



Obr.7: Výskyt diabetu 2. typu v jednotlivých zemích světa v % populace mezi 20-69 lety
(www.idf.org)

2.4.1. Léčba diabetu

Hlavním cílem při léčbě diabetu je ochránit pacienta před dlouhodobými komplikacemi. Vzhledem k tomu, že přímou příčinou rozvoje diabetu 2. typu je inzulínová rezistence, je léčba cílena především na zvýšení inzulínové citlivosti jednotlivých tkání. První fází v prevenci a léčbě diabetu je především úprava životního stylu, později v kombinaci s vhodnými preparáty (obrázek 8).

Metformin

Metformin je lékem první volby u obézních diabetiků. Patří do skupiny léčiv s názvem biguanidy a nyní je jediným biguanidem na trhu. Působí zejména na játra a kosterní sval. Metformin je vhodný k léčbě diabetu, protože zvyšuje citlivost k inzulínu a snižuje riziko kardiovaskulárních komplikací. Je oblíben pro minimum závažných vedlejších účinků a nevyvolává vzestup hmotnosti. Metforminu je věnována celá následující kapitola.

Thiazolidindiony

Thiazolidindiony (TZD) jsou ligandy receptorů aktivovaných proliferátory peroxisomů (PPAR). Existují 3 izoformy PPAR: PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . Thiazolidindiony jsou agonisty PPAR γ , které jsou exprimovány hlavně v tukové tkáni. TZD stimulují diferenciaci adipocytů, utilizaci mastných kyselin a podporují ukládání tuků v subkutánních ložiscích na úkor ukládání do viscerálního tukového depa. Snižují tak hladinu volných mastných kyselin v plazmě a působí proti ukládání ektopického tuku. TZD stimulují sekreci adiponektinu z tukové tkáně. Adiponektin snižuje sekreci TNF α makrofágy a tím působí protizánětlivě. Mezi vedlejší účinky těchto preparátů patří hlavně nabývání na váze a zadržování vody v těle. Jediným dnes používaným preprátem z řady TZD je pioglitazon (Stumvoll *et al.*, 2005).

Inkretiny

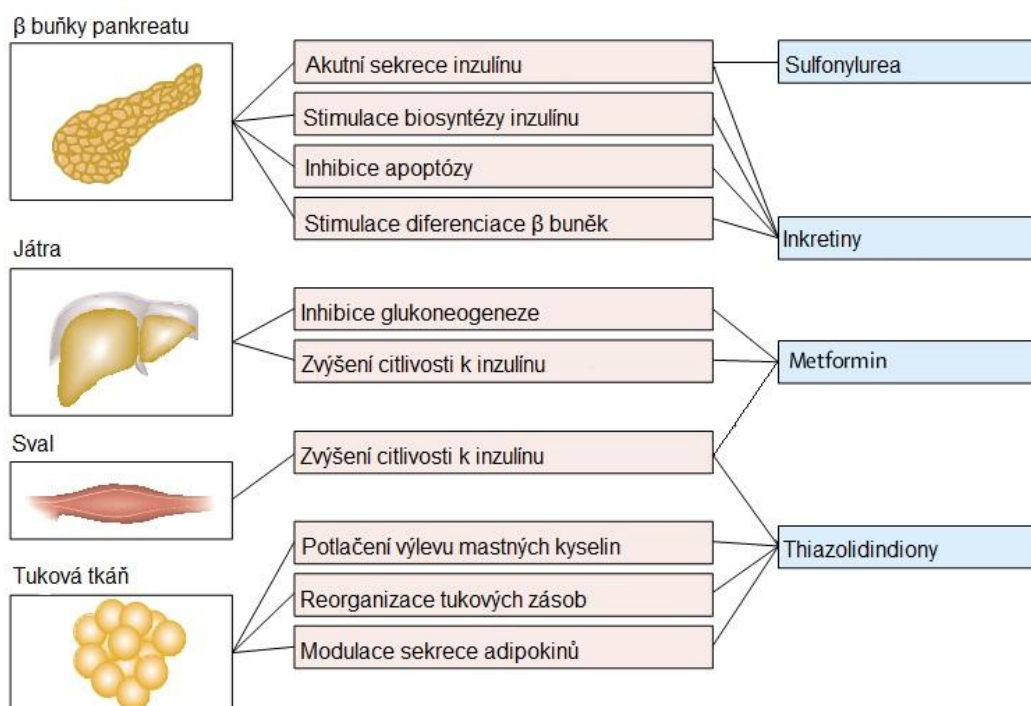
Inkretiny jsou hormony produkované enterokrinními buňkami střeva. Jedná se o peptid podobný glukagonu-1 (GLP-1) a glukózo-dependentní inzulínotropický polypeptid (GIP). Jejich sekrece je stimulována příjmem potravy a jejím průchodem střevem. Inkretiny stimulují sekreci inzulínu a tak působí na metabolismus velmi příznivě. Inkretiny jsou během několika minut po sekreci inaktivovány enzymem dipeptidyl peptidázou 4 (DPP-4), proto byly vyvinuty analogy GLP-1 rezistentní k DPP-4 a také inhibitory DPP-4. Tyto přípravky jsou v současné době doporučovány, pokud samotný metformin nedokáže udržet stálou glykémii. Inkretiny jsou velmi dobře tolerovány a mají jen velmi málo závažných vedlejších účinků (Garber *et al.*, 2013).

Deriváty sulfonylurey

Preparáty na bázi sulfonylurey posilují sekreci inzulínu. Účinkují prostřednictvím uzavření draslíkových kanálů na plazmatické membráně β buněk pankreatu. To pak vede k depolarizaci membrány a následnému vylití inzulínu. Sulfonylurey účinkují nezávisle na hladině inzulínu v plazmě, proto při jejich užívání hrozí rozvoj hypoglykémie (Stumvoll *et al.*, 2005).

Exogenní inzulín

Udržení hladiny inzulínu je důležité pro zachování účinků metforminu a TZD, které bez dostatečné hladiny inzulínu nejsou efektivní. Samotný inzulín pouze nahrazuje nedostatečnou funkci pankreatu, ale nepřispívá k léčbě ani zpomalení rozvoje nemoci. Inzulínové injekce je vhodné kombinovat s metforminem, pokud samotný metformin ztrácí na účinnosti. Kombinace s TZD je v mnoha zemích Evropy zakázána, protože nese zvýšené riziko otoků a srdečního selhání (Stumvoll *et al.*, 2005) .



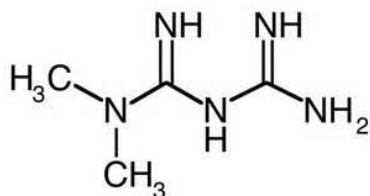
Obr. 8: Preparáty k léčbě diabetu a jejich účinky

(přepřacováno z Stumvoll *et al.*, 2005)

2.5. Metformin

Metformin (1,1-dimethyl biguanid) je celosvětově nejvíce předepisovaným lékem pro pacienty s diabetem 2. typu. Biguanidy jsou deriváty guanidinu, jež se nachází v extraktech z rostliny *Galega officinalis*, česky Jestřabina lékařská. Tato rostlina se používala už ve středověku na léčbu potíží, které dnes můžeme považovat za symptomy metabolického syndromu. Syntetické biguanidy byly syntetizovány a zkoumány ve 30. letech 20. století a metformin, dokonce pod svým současným jménem Glucophage, byl uveden na trh už v roce 1957 (Bailey a Day, 2004). V současné době je metformin předepsán více než 120 milionům lidí na celém světě. Jeho hlavním příznivým účinkem je schopnost zvyšovat citlivost tkání k inzulínu bez současného zvýšení inzulínové sekrece. Tím snižuje míru inzulínové rezistence a brání rozvoji hyperinzulinémie. Je oblíben pro svou schopnost snižovat glykémii diabetických pacientů bez rizika rozvoje hypoglykémie a zlepšuje lipidový metabolismus.

Metformin působí na různé tkáně, nejdůležitější je však jeho působení na játra a kosterní svalstvo. Metformin v játrech inhibuje glukoneogenezi a lipogenezi, sekreci VLDL částic a zvyšuje oxidaci mastných kyselin, tím snižuje podíl lipidů v játrech a působí proti rozvoji jaterní steatózy. V kosterním svalu metformin zvyšuje citlivost k inzulínu a stimuluje vychytávání glukózy (Bosi, 2009). Byly také prokázány příznivé účinky metforminu na kardiovaskulární systém, a to jak preventivní, tak po navození ischemie (UKPDS Group, 1998; Yin *et al.*, 2011). V současné době také bylo prokázáno, že metformin snižuje riziko rozvoje některých druhů rakoviny a syndromu polycystických ovárií (Tang *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2005).



Obr. 9: Struktura metforminu (1,1 dimethyl biguanid).

(www.wikipedia.org)

Při podávání metforminu se ojediněle vyskytují i vedlejší nežádoucí účinky. V porovnání s jinými preparáty jsou ale méně závažného charakteru. Jedná se hlavně o poruchy zažívacího systému, např. nevolnost, bolest břicha či ztráta chuti k jídlu. Tyto příznaky jsou podmíněny dávkou a mohou být zmírněny jejím pozvolným navyšováním. Závažným vedlejším účinkem je laktátová acidóza, která častěji postihovala pacienty léčené dnes již nepovoleným biguanidem, fenforminem. Laktátová acidóza má vysokou mortalitu 30-50%, ale při vyloučení pacientů s kontraindikačním stavem (pokročilá renální insuficience, těžké srdeční selhání, porucha funkce jater) je riziko jejího rozvoje velmi nízké (Bosi, 2009).

V důsledku působení metforminu v mitochondriích dochází k poklesu poměru ATP/AMP v buňce. Tento pokles stimuluje v buňkách glykolýzu a metformin blokuje vstup laktátu do glukoneogeneze. Následkem dochází ke zvýšení hladiny laktátu v krvi. Za běžných podmínek je laktát zlikvidován tkáněmi schopnými ho oxidovat, což jsou zejména srdce a játra. Pokud je inhibice komplexu I nadměrná, může dojít k rozvoji laktátové acidózy, která je možným závažným vedlejším účinkem léčby biguanidy. Jak už bylo dříve uvedeno, riziko rozvoje je ale u metforminu relativně nízké. Významně vyšší riziko představovalo užívání dnes již nepoužívaného přípravku fenforminu, příbuzného metforminu. Metformin je lipofilní molekula nesoucí kladný náboj. Je schopna pomalu prostupovat mitochondriální membránou a hromadí se uvnitř mitochondrie. Pokud jeho koncentrace v matrix mitochondrie vzroste, následkem zvýšení inhibice respiračního řetězce klesne membránový potenciál a to zabrání jeho další akumulaci. Fenformin je na rozdíl od metforminu lipofilnější a hydrofobnější. Jeho transport není zpětnovazebně inhibován, takže jeho působení na respirační řetězec je rychlejší a intenzivnější, což často vede k rozvoji laktátové acidózy (Owen *et al.*, 2000).

2.5.1. Metformin a AMPK

Metformin je všeobecně považován za aktivátor AMPK. Aktivace AMPK je pravděpodobně důsledkem působení metforminu na mitochondrie. To bylo prokázáno v dvěma nezávisle na sobě pracujícími skupinami. Tyto studie ukázaly, že metformin mírně inhibuje komplex I respiračního řetězce mitochondrií. Mírná inhibice sníží poměr ATP/ADP, ADP je poté rozloženo adenylát kinázou na AMP a to se následně podílí na aktivaci AMPK (Owen *et al.*, 2000, El-Mir *et al.*, 2000). Dle dalšího navrženého mechanismu metformin neaktivuje AMPK prostřednictvím inhibice respiračního řetězce, ale inhibicí enzymu AMP-deaminázy (AMPD). Tento enzym degraduje AMP a je součástí purinového cyklu. Jeho inhibice zvyšuje hladinu AMP, díky které pak dojde k aktivaci AMPK. Pro tuto hypotézu hovoří fakt, že účinek metforminu zmizel u myši s vyřazeným genem pro AMPD. Naproti tomu vyřazení genu pro adenylát kinázu nemělo na účinek metforminu žádný efekt (Ouyang *et al.*, 2011).

I přes mnoho článků potvrzujících význam AMPK pro účinek metforminu, na myším modelu s delecí genu pro jaterní AMPK bylo prokázáno, že pro účinek metforminu nejsou AMPK a LKB1 nezbytné. Tyto poznatky ukazují, že existují i jiné mechanismy, jimiž metformin působí na metabolismus buňky (Foretz *et al.*, 2010).

2.5.2. Účinek metforminu v kosterním svalu

Přestože kosterní svaly zaujímají jen 45% tělesné hmotnosti, na inzulínem stimulovaném vychytávání glukózy se podílí až 80% (Ferrannini *et al.*, 1988). Potenciální význam účinku metforminu v této tkáni by tedy neměl být opomíjen. Metformin v kosterním svalu vyvolává účinky podobné inzulínu, pravděpodobně zvýšením citlivosti tkání k tomuto hormonu. Kosterní svaly exprimují přenašeče OCT 1 a OCT 3, které zprostředkují vstup metforminu do buněk. Přesný mechanismus, jakým metformin působí na inzulínovou signalizaci, zůstává neobjasněn. Metformin *in vitro* zvyšuje jak bazální, tak inzulínem stimulovaný příjem glukózy (Turban *et al.*, 2012). Množství studií ukazuje, že metformin může zvyšovat inzulínovou signalizaci a zvyšovat účinky hormonu působením

na členy aktivované v časně fázi signalizace. Jedná se zejména o zvýšení fosforylace a kinázové aktivity IR. Po vystavení svalových buněk metforminu došlo také ke zvýšení fosforylace IRS (Kumar *et al.*, 2002; Dominguez *et al.*, 1996). Významnou roli v působení metforminu zřejmě hraje atypická protein kináza C (aPKC), jejíž aktivaci *in vitro* po působení metforminu prokázalo několik prací (Turban *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2006). Tato kináza je důležitá pro další signalizaci translokace váčků s glukózovými přenašeči.

Protein, který by potenciálně mohl zprostředkovat účinky metforminu na utilizaci glukózy svalovými buňkami je AMPK. Bylo prokázáno, že aktivace této kinázy zvyšuje vychytávání glukózy prostřednictvím zvýšené exprese a translokace váčků s GLUT 4 v kosterních svalech potkanů *in vitro* (Kurth-Kraczek *et al.*, 1999). Tento předpoklad je také podpořen pozorováním, že fosforylace AMPK je zvýšena *in vivo* v kosterních svalech diabetiků, kteří užívali metformin (Musi *et al.*, 2002). Na druhé straně u myocytů s nefunkční AMPK je efekt metforminu na vychytávání glukózy sice snížen, ale pouze o 35%, což naznačuje, že významný podíl tvoří i mechanismy nezávislé na AMPK (Turban *et al.*, 2012). Další studie navrhuje, že metformin v buňkách *in vitro* prostřednictvím AMPK zvyšuje expresi proteinu Rab 4 a fosforylaci proteinu AS160, což vede ke zvýšení exocytózy s váčky obsahujícími GLUT 4 přenašeče (Lee *et al.*, 2010).

Metformin v kosterním svalu také zvyšuje β oxidaci mastných kyselin a to stejným způsobem jako v játrech, působením na AMPK a CPT 1. Zvýšená dodávka mastných kyselin do mitochondrie umožní jejich zvýšenou degradaci (Consitt *et al.*, 2006).

2.5.3. Účinek metforminu v játrech

Účinek metforminu především v játrech je způsoben zvýšenou expresí přenašeče organických kationtů 1 (OCT 1) v hepatocytech, který zprostředkuje přenos molekuly metforminu přes plazmatickou membránu (Shu *et al.*, 2007).

Hlavním účinkem metforminu je snižování jaterní produkce glukózy, která je u prediabetických a diabetických pacientů často abnormálně zvýšená. Glukoneogeneze je regulována na úrovni exprese glukoneogenních enzymů, aktivity jednotlivých enzymů a

dostupnosti substrátů.

Předpoklad účasti AMPK při inhibici glukoneogeneze metforminem byl nejdříve podpořen nálezem, že u myši s dysfunkční nadřazenou kinázou LKB1 metformin snižuje glykémii výrazně méně než u kontrolní skupiny. Usuzovalo se, že dráha LKB1/AMPK kontroluje expresi glukoneogenních enzymů prostřednictvím fosforylace proteinu CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2). Nefosforylovaný CRTC2 se translokuje do jádra, kde spolu s dalšími proteiny spouští transkripci glukoneogenních genů. Pokud je CRTC2 fosforylován AMPK nebo jí příbuznou kinázou na Ser¹⁷¹, zůstává v cytoplazmě (Shaw *et al.*, 2005). Bylo však prokázáno, že CRTC2 je ve stavu inzulinové rezistence na této aminokyselině O-glykozylován. Fosforylace na téže místě je tedy velmi nepravděpodobná (Dentin *et al.*, 2008). Možným dalším mechanismem je fosforylace proteinu CBP (CREB-binding protein) a následný rozpad komplexu CREB-CBP-CRTC2, který se nachází na promotorech glukoneogenních genů. Fosforylace CBP zahrnuje aktivaci AMPK a atypické PKC ι/λ (He *et al.*, 2009). AMPK zvyšuje hladiny proteinu SHP (orphan nuclear receptor small heterodimer partner), který brzdí expresi glukoneogenních genů působením na komplex CREB-CBP-CRTC2. SHP přímo váže protein CREB a kompetuje tak s CRTC2 (Kim *et al.*, 2008).

Problematiku mechanismu inhibice glukoneogeneze metforminem zkomplikoval ještě více objev, že metformin účinně snižuje glykémii i u myši s nefunkční jaterní AMPK a LKB1. Také hepatocyty s knockoutem AMPK vykazují normální expresi glukoneogenních genů a produkci glukózy. Pokud tedy regulace glukoneogeneze neprobíhá na úrovni aktivace AMPK a regulaci transkripce vybraných genů, mechanismus fungování metforminu může být zprostředkován snížením jaterního energetického potenciálu a zvýšením hladin AMP, které je alosterickým inhibitorem klíčových glukoneogenních enzymů, například fruktóza-1,6-bisfosfatázy (Foretz *et al.* 2010).

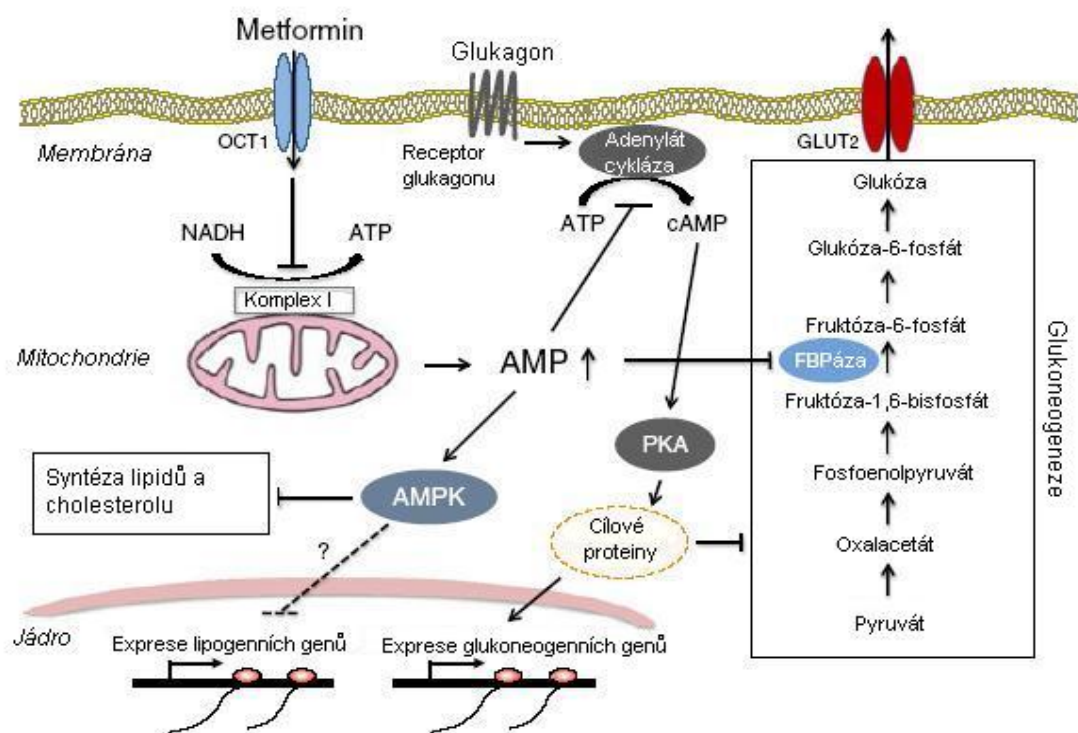
Další navržený mechanismus účinku metforminu na glukoneogenezi je nezávislý na AMPK. Inzulín a glukagon hrají opačné role v kontrole jaterní produkce glukózy. Během hladovění je metabolismus hepatocytu řízen hormonem glukagonem, který podporuje glykogenolýzu a glukoneogenezi. Ve stavu inzulinové rezistence jsou hladiny

glukagonu zvýšené, proto je potřeba jeho hladiny snížit nebo blokovat jeho signalizaci v hepatocyty. Glukagon v buňce spouští adenylát cyklázu, která produkuje cyklické AMP (cAMP) a následně stimuluje protein kinázu A (PKA). PKA fosforyluje další proteiny a zvyšuje glukoneogenezi. Zvýšená hladina AMP v hepatocyty následkem působení metforminu inhibuje adenylát cyklázu, snižuje se množství cAMP, nedochází k signalizaci přes PKA a tím dojde k zablokování glukoneogeneze indukované glukagonem (Miller *et al.*, 2013). Inkretin GLP-1 účinně snižuje sekreci glukagonu z pankreatu a tím působí příznivě na jaterní metabolismus. Bylo prokázáno, že metformin působí na sekreci inkretinů, zejména GLP-1. Metformin při dlouhodobém podávání zvyšuje plazmatické hladiny GLP-1 u diabetických a nediabetických pacientů (Manucci *et al.*, 2004). Metformin také zvyšuje expresi inkretinového receptoru na β -buňkách pankreatu, je tedy možné, že některé efekty metforminu mohou být zprostředkovány zesílením účinků inkretinů (Maida *et al.*, 2011).

Příznivý účinek metforminu na lipidový metabolismus jater byl prokázán v mnoha studiích. Metformin snížil obsah lipidů v játrech u hlodavců krmených vysokotukovou dietou, ale i u pacientů v klinických studiích (Lin *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2004). Tento efekt je pravděpodobně zprostředkován aktivací AMPK, která zvyšuje oxidaci mastných kyselin a snižuje lipogenezi, prostřednictvím mechanismů, které již byly popsány výše (Zang *et al.*, 2004). Dále metformin snižuje lipogenezi prostřednictvím inhibice exprese a transkripční aktivity SREBP1-c (sterol-regulatory element binding protein 1-c), proteinu řídícího *de novo* lipogenezi (Li *et al.*, 2011). Kromě inhibice lipogeneze metformin inhibuje také syntézu cholesterolu a to prostřednictvím inhibice enzymu 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA-reduktázy (HMG-CoA reduktáza), který je také inhibován fosforylací AMPK (Henin *et al.*, 1995).

Jen málo publikací se věnuje účinkům metforminu na inzulínovou signalizaci v játrech. Na lidských hepatomových buňkách bylo prokázáno, že 30-ti minutová expozice buněk metforminu dokáže zvýšit fosforylaci klíčových proteinů inzulínové signalizace. Tyrosinová fosforylace inzulínového receptoru byla zvýšena o 78 %, zvýšila se aktivace IRS a také translokace váček GLUT 1 (Gunton *et al.*, 2003). V témže roce se ukázalo, že

metformin působí preventivně proti zhoršení inzulinové signalizace navozené dlouhodobým působením inzulinu. Po vystavení inzulin-rezistentních buněk metforminu se zvýšila fosforylace substrátů inzulinového receptoru a asociace PI3K s IRS (Yuan *et al.*, 2003).



Obr.10: Účinky metforminu v játrech.

(přepřacováno z Rena, 2013)

2.5.4. Účinek metforminu na tukovou tkáň

Stejně jako v kosterním svalu, i v tukové tkáni metformin aktivuje AMPK. Z toho vyplývají jeho další účinky na tuto tkáň, jako je zvýšený vstup glukózy a β -oxidace MK. Působením metforminu na lidské adipocyty *in vitro* se zvýšil uptake glukózy buňkami a exprese přenašečů GLUT 4 (Grisouard *et al.*, 2010). Metformin také zvyšuje expresi a fosforylaci proteinů Cap a Cbl, které se přímo účastní regulace exocytózy váčků s glukózovými přenašeči na plazmatickou membránu (Lee *et al.*, 2012). Bylo také prokázáno, že metformin zabraňuje rozvoji inzulínové rezistence v adipocytech vystavených hyperinzulinémií (Pryor *et al.*, 2000). Prostřednictvím utlumení exprese lipogenních enzymů a transkripčních faktorů nutných pro adipogenezi metformin snižuje lipogenezi (Alexandre *et al.*, 2008). Metforminem aktivovaná AMPK také zvyšuje míru lipolýzy a β -oxidace, což snižuje obsah TAG v buňkách a jejich celkovou velikost. Zvýšení degradace mastných kyselin by také vysvětlovalo, proč dojde ke snížení uvolňování mastných kyselin z adipocytu (Lenhard *et al.*, 1997).

2.6. n-3 polynenasycené mastné kyseliny

Nejen množství, ale i druh tuků přijímaných v potravě hraje zásadní roli při rozvoji metabolického syndromu. Velmi příznivé účinky na metabolismus má příjem polynenasycených mastných kyselin řady n-3 (n-3 PUFA, omega-3). n-3 PUFA jsou esenciální mastné kyseliny, které nemohou být syntetizovány organismem. Kyseliny eikosapentaenová (EPA 20:5 n-3) a dokosaheptaenová (DHA 22:6 n-3) jsou syntetizovány mořským fytoplanktonem a díky potravnímu řetězci se dostávají do mořských ryb a jiných živočichů. DHA je nezbytná pro funkci buněčných membrán a správnou funkci oční sítnice. Rostlinného původu je kyselina α -linolenová (ALA), která je prekurzorem pro syntézu EPA a DHA. Účinnost syntézy je velmi nízká, proto je nutné tyto mastné kyseliny přijímat v potravě. Nejlepším zdrojem n-3 PUFA jsou tučné mořské ryby jako tuňák, sardinky, makrela nebo losos.

Příjem n-3 PUFA v potravě snižuje rizika kardiovaskulárních onemocnění. n-3 PUFA působí protizánětlivě a u laboratorních zvířat mají významný antiobezogenní efekt. U populací konzumujících velké množství tučných mořských ryb je prevalence kardiovaskulárních onemocnění výrazně nižší než u ostatních skupin obyvatel (Kagawa *et al.*, 1982). Podávání n-3 PUFA vedlo u lidí i pokusných zvířat ke snížení hladiny TAG a celkového cholesterolu v krvi a zvýšení hladiny lipoproteinu s vysokou hustotou - HDL cholesterolu (Lombardo a Chicco., 2006). U lidí zatím nebylo jasně prokázáno, zda n-3 PUFA mohou působit preventivně proti zhoršení inzulinové citlivosti a rozvoji diabetu 2. typu (Riserus *et al.*, 2009).

PUFA jsou významnou složkou membránových fosfolipidů. Působením fosfolipázy A2 jsou mastné kyseliny uvolněny z fosfolipidu a přeměněny na aktivní metabolity, které se podílí na protizánětlivém působení EPA a DHA (Flachs *et al.*, 2009). Protizánětlivé účinky n-3 PUFA byly zpočátku připisovány snížení míry syntézy prozánětlivých eikosanoidů, derivátů kyseliny arachidonové, jejichž substrátem jsou n-6 PUFA. V posledních letech se ale ukazuje, že za příznivými účinky n-3 PUFA mohou stát nové biologicky aktivní lipidové mediátory protektiny a resolviny (González-Pérez *et al.*, 2009).

Působením n-3 PUFA se také zvýšila sekrece adiponektinu z tukové tkáně a citlivost periferních tkání k inzulínu (Tishinsky *et al.*, 2012).

2.6.1. n-3 PUFA a kosterní sval

n-3 PUFA zvyšují inzulínovou citlivost kosterního svalu nepřímo - zvýšením sekrece adiponektinu, ale i přímým působením. Zvyšují expresi AMPK, která podporuje utilizaci glukózy zvýšením translokace váčků s GLUT 4 na membránu (Motawi *et al.*, 2009). AMPK také zvyšuje oxidaci mastných kyselin (Lam *et al.*, 2011). Lipidové složení plazmatické membrány je ovlivněno charakterem lipidů přijímaných v potravě. Přidáním n-3 PUFA do potravy se zvýšil podíl nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech sarkolemy – plazmatické membrány svalových buněk. Vyšší podíl nenasycených mastných kyselin zvýšil fluiditu membrány buněk kosterního svalstva. S vyšší fluiditou membrány se zvýšil i počet inzulínových receptorů a inzulínová signalizace (Martín de Santa Olalla *et al.*, 2009). EPA a DHA inhibují expresi Scd1 mRNA. Stearoyl-CoA desaturáza (SCD1) je enzym přeměňující nasycené mastné kyseliny na mononenasycené mastné kyseliny. Snížená aktivita a míra exprese enzymu SCD1 vede ke zvýšení míry oxidace mastných kyselin, zvýšení inzulínové citlivosti a snížení akumulace lipidů v kosterním svalu. Inhibice SCD1 vede k utlumení lipogeneze a zvýšené utilizaci glukózy (Poudyal a Brown, 2011). EPA zvyšuje příjem glukózy a mastných kyselin přes plazmatickou membránu. Zvýšená exprese FAT/CD36, GLUT1 přenašečů a syntéza TAG byla prokázána *in vitro* na lidských myocytech (Aas *et al.*, 2006). Některé jiné studie ale benefiční účinky n-3 PUFA u pacientů neprokázaly (Mostad *et al.*, 2006).

n-3 PUFA mají prokázaný preventivní potenciál. Podávání n-3 PUFA dokáže u hlodavců zabránit zhoršení inzulínem stimulované utilizaci glukózy při příjmu vysokého množství nasycených mastných kyselin. Podávání vyššího množství rybího oleje po 4 týdny dokonce dokázalo zvrátit již zhoršenou utilizaci glukózy po inzulínové stimulaci (Tishinsky *et al.*, 2012). Nahrazením n-3 PUFA za n-6 PUFA ve vysokotuké dietě bylo docíleno podobné míry aktivace členů inzulínové signální dráhy a obsahu přenašečů

GLUT4 jako byly pozorovány u jedinců na standardní dietě. Jedná se zejména o míru tyrosinové fosforylace IR a IRS, aktivitu PI3K a obsah přenašečů GLUT-4 (Storlien *et al.*, 1987). Na rozvoji inzulínové rezistence se významně podílí i zvýšená exprese a aktivace PKC θ . Přidáním rybího oleje do vysokocukerné diety byla exprese PKC θ v kosterním svalu hlodavců normalizována až na úroveň, která byla pozorována u jedinců na standardní dietě. Podávání rybího oleje také zvrátilo zhoršenou stimulaci syntézy glykogenu a vrátilo hladiny volných mastných kyselin do normálních hladin (Lombardo *et al.*, 2007). Už nastavená celotělová inzulínová rezistence ale nemůže být suplementací n-3 PUFA zvrácena.

2.6.2. n-3 PUFA a játra

n-3 PUFA významně regulují jaterní genovou expresi. Tyto mastné kyseliny brání rozvoji jaterní steatózy a zlepšují citlivost k inzulínu. Exprese genů podílejících se na citlivosti tkáně k inzulínu jako PPAR γ , GLUT 4 a IRS byla působením n-3 PUFA zvýšena (González-Périz *et al.*, 2009). n-3 PUFA v játrech působí zejména na transkripční faktory PPAR α a SREBP-1. Tyto faktory mají rozmanité efekty na lipidový a glukózový metabolismus. PPAR α snižuje hladinu lipidů v plazmě a zvyšuje mitochondriální beta oxidaci. Na hlodavčím modelu jaterní steatózy bylo prokázáno, že agonista PPAR α zabraňuje rozvoji steatózy a zvrátí již rozvinutou steatózu. n-3 PUFA jsou aktivátory PPAR α a spouští transkripci genů spojených s lipidovým metabolismem a oxidací mastných kyselin. Prostřednictvím PPAR α mohou n-3 PUFA také snižovat hladiny TNF α a IL-6 (Stienstra *et al.*, 2007). SREBP-1 ovlivňuje zejména syntézu mastných kyselin. V jádře aktivuje transkripci genů zahrnutých v *de novo* lipogenezi a glykolýze. n-3 PUFA snižují podíl SREBP-1 v jádře a tak snižují *de novo* lipogenezi. Tento efekt byl prokázán *in vitro* i *in vivo*. Vzhledem k tomu, že lipogeneze v játrech je ve stavu inzulínové rezistence trvale zvýšená a přispívá k rozvoji steatózy, je tento účinek vysoce příznivý (Botolin *et al.*, 2006).

Další jaderné receptory ovlivňující jaterní metabolismus jsou LXR (liver x

receptor), FXR (farnesoid x receptor) a HNF 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α). LXR ovlivňuje transport a metabolismus mastných kyselin a cholesterolu. Jeho exprese není n-3 PUFA ovlivněna (Pawar *et al.*, 2003). HNF-4 α hraje důležitou roli produkci lipoproteinů a zvyšuje expresi glukokinázy. Jeho exprese je stimulována n-6 PUFA a inhibována n-3 PUFA (Sampath a Ntambi, 2005). FXR kontroluje syntézu žlučových kyselin a jejich export. Také snižuje obsah triacylglycerolů v játrech a to prostřednictvím aktivace PPAR α a inhibice SREBP-1. n-3 PUFA jeho expresi zvyšují. Dalším možným mechanismem působení n-3 PUFA je inhibice glykolýzy prostřednictvím utlumení carbohydrate regulatory element-binding protein (ChREBP) nebo útlum syntézy mastných kyselin prostřednictvím působení na FAS (Davidson, 2006).

Existují rozdílné výsledky popisující aktivaci AMPK prostřednictvím n-3 PUFA v játrech. Některé práce dokládají aktivaci AMPK v játrech (Suchankova *et al.*, 2005) i tukové tkáni (Lorente-Cebrián *et al.*, 2009), jiné žádnou změnu v aktivaci AMPK neprokázaly (Dobrzyn *et al.*, 2005). Tyto rozdíly mohou být zapříčiněny rozdílným příjmem n-3 PUFA či stavem zvířat. Výsledky Jelenik *et al.* prokazují aktivaci jaterní AMPK podjednotky $\alpha 2$ n-3 PUFA v jaterních extraktech. Podjednotka $\alpha 2$ v játrech je zodpovědná za snížení jaterní produkce glukózy a udržování glykémie nalačno. Bylo prokázáno že $\alpha 2$ je nezbytná pro zachování účinků n-3 PUFA v játrech na inzulínovou citlivost, obsah lipidů v játrech i plazmě a hladinu volných mastných kyselin v plazmě za podmínek hyperinzulinemického euglykemického clampu. Akumulace diacylglycerolů velmi nepříznivě působí na inzulínovou citlivost buněk a spouští zde kinázy inhibující přenos inzulínového signálu. Diacylglyceroly s vyšším podílem nenasycených mastných kyselin v molekule jsou efektivnějšími aktivátory PKC než nasycené diacylglyceroly a tím působí velmi nepříznivě na inzulínovou signalizaci. Podávání n-3 PUFA účinně zabránilo akumulaci polynenasycených diacylglycerolů v hepatocytech (Jelenik *et al.*, 2010).

Příjem n-3 PUFA snížil syntézu prozánětlivých eikosanoidů odvozených od n-6 PUFA a zvýšil produkci protektinů a resolvinů. Tyto molekuly jsou zodpovědné za zvýšení inzulínové citlivosti a zabránění rozvoje steatózy v játrech. Intraperitoneální aplikace resolvinu či protektinu vykazovaly stejné účinky jako podávání n-3 PUFA, je tedy

pravděpodobné, že na účinku n-3 PUFA v játrech se resolviny a protektiny významně podílejí (González-Pérez *et al.*, 2009).

V důsledku nadměrného příjmu mastných kyselin do jater a jejich zvýšenému odbourávání, dochází ke zvýšení oxidativního stresu a tvorby ROS. n-3 PUFA mají potenciální ochrannou úlohu proti poškození jaterních tkání kyslíkovými radikály. Snížení míry fibrózy jater podáváním EPA bylo úměrné snížení hladiny ROS. EPA také snížila nárůst hladiny kyslíkových radikálů a snížila plazmatické hladiny markerů oxidativního stresu (Di Minno *et al.*, 2012).

2.6.3. n-3 PUFA a tuková tkáň

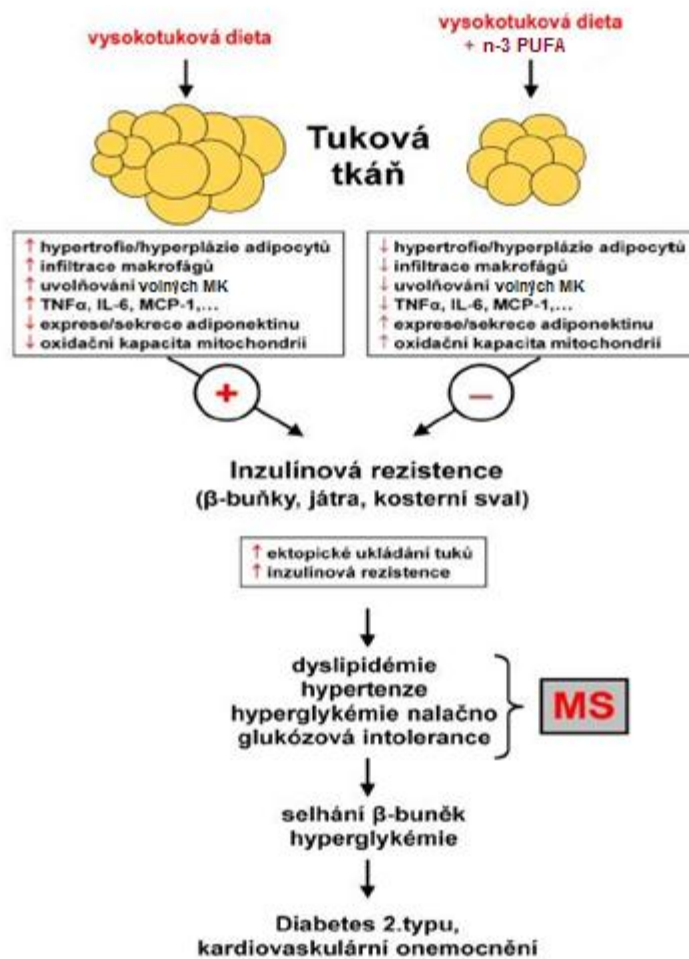
Tuková tkáň je významným místem působení n-3 PUFA. n-3 PUFA u myši zpomalují zvětšování viscerální tukové tkáně a inhibují zde proliferaci tukových buněk. Tím působí i proti vzniku inzulinové rezistence, jejíž výskyt je s viscerální obezitou úzce spojen. Ukazuje se, že n-3 PUFA jsou významnými regulátory transkripce. Jejich metabolické efekty jsou zprostředkovány zejména působením na jaderné receptory PPAR α , PPAR δ a PPAR γ . n-3 PUFA jsou ligandy těchto receptorů a jejich prostřednictvím ovlivňují metabolismus tukové tkáně. Jedním z cílů n-3 PUFA je PPAR γ , který ovlivňuje expresi genů přenašečů mastných kyselin, lipogenních genů a genů regulujících diferenciaci adipocytů. Aktivace PPAR α a PPAR δ stimuluje oxidaci mastných kyselin v mitochondriích i peroxisomech (Madsen *et al.*, 2005).

Účinky n-3 PUFA jsou částečně zprostředkovány také AMPK, kterou n-3 PUFA pravděpodobně aktivují (Lorente-Cebrián *et al.*, 2009). EPA a DHA stimulují oxidativní metabolismus a mitochondriální biogenezi aktivací PGC1 α (PPAR γ koaktivátor α). Tím brání vzniku hypertrofických adipocytů a zmenšují ty existující. n-3 PUFA inhibují diferenciaci adipocytů a snižují expresi enzymů účastnících se lipogeneze a uvolňování mastných kyselin do krevního řečiště. Sníží se tak hladina volných mastných kyselin v plazmě a lipotoxicita. Tyto účinky jsou dominantní zejména ve viscerální tukové tkáni (Flachs *et al.*, 2005). n-3 PUFA inhibují proliferaci tukových buněk *in vivo*. Podávání n-3

PUFA v dietě vedlo ke snížení jak hypertrofie, tak hyperplázie adipocytů. Menší adipocyty jsou více citlivé k inzulínu, méně lipolytické a produkují méně prozánětlivých cytokinů (Hensler *et al.*, 2011). n-3 PUFA také ovlivňují expresi GLUT 4 a mohou tak ovlivnit vstup glukózy do buněk. Přidání EPA a DHA do vysokotuké diety chrání zvířata před zhoršením exprese GLUT 4 při rozvoji inzulínové rezistence (Ruzickova *et al.*, 2004).

Inzulínová rezistence a obezita jsou spojeny s poklesem sekrece adiponektinu z tukové tkáně. Nahrazení 15% lipidů v dietě koncentrátem EPA/DHA zabránilo rozvoji obezity a inzulínové rezistence a zvýšilo jak sekreci adiponektinu z viscerální tukové tkáně, tak jeho plazmatickou hladinu (Flachs *et al.*, 2006). Existující data naznačují, že sekrece adiponektinu je stimulována prostřednictvím působení n-3 PUFA na receptory PPAR γ , které ovlivňují expresi genu pro adiponektin (Iwaki *et al.*, 2003)

Hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 a IL-6) snižujících citlivost tkáně k inzulínu byly působením n-3 PUFA sníženy (Mullen *et al.*, 2010). Adipocyty vystavené DHA exprimovaly také více protizánětlivého IL-10 v porovnání s kontrolními buňkami. Nahrazení části lipidů v dietě n-3 PUFA zabránilo infiltraci makrofágů do tukové tkáně a snížilo expresi genů zánětlivých faktorů. Zároveň nedošlo ke snížení množství tuku, což dokazuje, že protizánětlivé a antiobezogenní účinky n-3 PUFA jsou na sobě nezávislé (Todoric *et al.*, 2006). Protizánětlivé účinky n-3 PUFA mohou být zprostředkovány modulací jaderného faktoru κ B (NF κ B) a PPAR γ . PPAR γ inhibuje NF κ B a oba tyto transkripční faktory mohou být ovlivňovány mastnými kyselinami. Expozice tukové tkáně nasyceným mastným kyselinám vede k aktivaci Toll like receptoru 4 (TLR4). Nasycené mastné kyseliny slouží jako ligandy tohoto receptoru a spouští právě dráhu vedoucí k aktivaci NF κ B. Bylo prokázáno, že EPA tlumí sekreci prozánětlivých adipokinů jako IL-6 a monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) prostřednictvím inhibice NF κ B v adipocytech *in vitro* (Siriwardhana *et al.*, 2012).



Obr. 11: Účinky n-3 PUFA v tukové tkáni.

(přelpracováno z Flachs *et al.*, 2009)

3. Cíle diplomové práce

Diplomová práce byla vypracována na Oddělení biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR. Toto oddělení se již dlouhodobě zabývá výzkumem potenciálu n-3 PUFA v prevenci a léčbě obezity a inzulínové rezistence na modelu myši s dietou indukovanou obezitou. Metformin je lékem první volby u pacientů s inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu. Metformin při dlouhodobém užívání zlepšuje inzulínovou rezistenci a normalizuje hladiny glukózy. Jeho akutní účinek na glukózovou homeostázu je však dosud málo charakterizován. Vzhledem k tomu, že již dříve bylo v naší laboratoři prokázáno, že n-3 PUFA mohou potencovat účinek antidiabetik (konkrétně thiazolidindionů) (Kuda *et al.*, 2009), byla použita kombinace metforminu a n-3 PUFA s cílem snížit dávku léčiva potřebnou pro vyvolání stejného efektu.

Specifické cíle práce byly:

- 1. Charakterizovat akutní účinek metforminu na glukózovou homeostázu myši se zhoršenou glukózovou tolerancí.**
- 2. Zjistit, zda n-3 PUFA ovlivňují akutní účinek metforminu na glukózovou homeostázu.**
- 3. Charakterizovat úlohu AMPK v akutním účinku metforminu a zjistit, zda je pro účinek metforminu na glukózovou homeostázu nezbytná $\alpha 2$ podjednotka AMPK.**
- 4. Charakterizovat zapojení členů inzulínové signalizační kaskády, jmenovitě Akt/PKB v játrech a kosterním svalu, do akutního účinku metforminu.**

4. Metody

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

akrylamid Serva, Německo

albumin hovězí sérový (BSA) Imresco, USA

aprotinin Fluka, ČR

benzamidin Sigma, USA

bisakrylamid Serva, Německo

diethylether Penta, ČR

difosforečnan sodný Lachema, ČR

disodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA-Na₂) Sigma, USA

dithiotreitol (DTT) Sigma, USA

dodecylsulfát sodný (SDS) Bio-Rad, USA

DTT Invitrogen, Německo

EDTA Serva, Německo

Ethanol Penta, ČR

fluorid sodný Lachema, ČR

glukóza (D-(+)-glukóza) Sigma, USA

glycerol Penta, ČR

glycin Serva, Německo

hydrogenuhličitan sodný FisherBiotech, USA

hydroxid sodný Penta, ČR

chlorid hořečnatý Fluka, USA

chlorid sodný Merck, Německo

inhibitor fosfatáz Serva, Německo

kyselina chlorovodíková Penta, ČR

Laemmli sample buffer Bio-Rad, USA

Leupeptin Sigma, USA

metformin hydrochlorid Merck, Německo

merkapt ethanol Serva, Německo

methanol.....	Penta, ČR
Odyssey blocker	Li-cor, USA
pentahydrát síranu hořečnatého.....	Lachema, ČR
pepstatin	Sigma, USA
peroxodisíran amonný (APS).....	Sigma, USA
phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF).....	Sigma, USA
tetramethylethylenediamin (TEMED).....)Bio-Rad, USA
TGS pufr	Bio-Rad, USA
Tris	Sigma, USA
Triton X-100	Serva, Německo
Trizma báze.....	Fluka, USA
Tween.....	Serva, Německo
Uhličitan sodný	Lachema, ČR
vinan sodný	Lachema, ČR

4.1.2. Přístroje a materiál

chirurgické nástroje.....	Medin, ČR
glukometr One touch ultra	LifeScan, USA
detekční proužky do glukometru.....	Life Scan, USA
pipety rozsahu 0,2 - 1000μl.....	Gilson, Francie
multikanálové pipety.....	Gilson, Francie
centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
mini centrifuga	Labnet, USA
vortex	Scientific Industries, USA
magnetická míchačka.....	IKA, USA
váhy ADAM.....	Adam Equipment, Velká Británie
analytické váhy	OHAUS, USA
sonikátor.....	Hielscher, Německo
třepačka MS3D	IKA, USA
termální box	Sanyo, Japonsko
spektrofotometr Sunrise BASIC Tecan.....	Tecan, Švýcarsko
aparatura na elektroforézu.....	Bio-Rad, USA

aparatura na polosuché blotování.....	Omni-Bio, ČR
Odyssey IR Imager.....	Li-cor, USA
Termoblok.....	Biometra, Německo
pH metr InLab level.....	WTW, Německo
homogenizátor Ultra-Turrax T8.01.....	IKA, Německo

4.2. Experimentální diety

V pokusech byly použity vysokotukové diety HFD (high fat diet) a HFD+F vyrobené ve Fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. Obě diety obsahují asi 60% energie v tucích. Dieta HFD obsahuje kukuřičný olej, který tvoří převážně n-6 PUFA. V dietě HFD+F je 15% lipidové složky nahrazeno koncentrátem EPA a DHA, což jsou n-3 PUFA.

Složení vysokotukové diety HFD (1 kg):

- 400 g standardní diety (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo)
- 340 g Sunaru (Hero, Švýcarsko)
- 250 g kukuřičného oleje (Oleofarm, Polsko)
- 10 g kukuřičného škrobu (Maizena, Česká republika)
- 0,21 g α -tokoferolu (Nutritional Biochemical corporation, USA)

Složení vysokotukové diety s obsahem n-3 polynenasycených mastných kyselin EPA a DHA, které tvoří 15% celkové hmotnosti lipidů (HFD+F) (1 kg):

- 400 g standardní diety (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo)
- 340 g Sunaru (Hero, Švýcarsko)
- 197,5 g kukuřičného oleje (Oleofarm, Polsko)
- 52,5 g koncentrátu EPAX 1050 TG (EPAX, Norsko)
(obsahuje 14% EPA a 46% DHA ve formě TAG, 4 mg/g α -tokoferolu)
- 10 g kukuřičného škrobu (Maizena, Česká republika)

Dieta	HFD	HFD+F
Energie (MJ/100g)	2,219	2,219
Metabolizovatelná energie (MJ/100g)	2,075	2,075
Proteiny (g/100g, %)	13,3	13,3
Tuk (g/100g, %)	34,5	34,5
Sacharidy (g/100g, %)	34,9	34,9
Vláknina (g/100g, %)	2,0	2,0

Tabulka č. 1: Podíl makronutrientů v jednotlivých dietách

Mastná kyselina	HFD	HFD+F
8:0	0.33	0.40
10:0	0.56	0.59
12:0	2.15	2.22
14:0	2.06	2.15
14:1n-5	0.11	0.11
16:0	13.68	12.77
16:1n-9	0.03	0.04
16:1n-7	0.27	0.40
18:0	2.97	3.07
18:1n-9	27.10	23.96
18:1n-7	0.83	0.85
18:2n-6	47.63	40.44
18:3n-6	0.01	0.01
18:3n-3	1.71	1.65
18:4n-3	0.05	0.18
20:0	0.16	0.30
20:1n-9	0.12	0.31
20:2n-6	0.06	0.11
20:3n-6	-	0.02
20:4n-6	-	0.19
20:3n-3	-	0.03
20:4n-3	-	0.09
20:5n-3 (EPA)	-	2.09
22:0	0.09	0.14
22:1n-9	-	0.04
22:4n-6	-	0.03
22:5n-6	-	0.19
22:5n-3	-	0.52
22:6n-3 (DHA)	-	7.11
24:0	0.05	-
Sum SFA	22.05	21.64
Sum MUFA	28.46	25.70
Sum n-6 PUFA	47.70	40.99
Sum n-3 PUFA	1.79	11.67

Tabulka č. 2: Obsah mastných kyselin v experimentálních dietách

(převzato z Kuda et al., 2009)

SFA-nasycené mastné kyseliny, MUFA-mononenasycené mastné kyseliny, PUFA-polynenasycené mastné kyseliny

4.3. Práce s laboratorními zvířaty

Zvířata

K experimentům byly použity myši kmene C57BL/6J, náchylné k rozvoji obezity indukované dietou. Zvířata byla chována a množena ve zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. Základem kolonie byly chovné páry dovezené z The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) v roce 1998.

Experimentální podmínky a manipulace se zvířaty

Myši byly chovány ve 22°C s volným přístupem k potravě i vodě. Ve zvěřinci probíhal 12-ti hodinový světelný režim (12 hodin světlo/ 12 hodin tma). Než byla zvířata nasazena do pokusů, byla krmena standartní dietou (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo). Spotřeba diety a hmotnost myši byly měřeny jednou týdně. Pokud byla zvířata chována po více kusech, spotřeba diety byla vypočtena podělením celkové spotřeby diety za 24 hodin počtem jedinců v kleci.

Dva experimenty byly provedeny na dospělých samcích chovaných ve standartních podmínkách. Třetí experiment byl proveden na dospělých samicích kmene C57BL/6J kontrolní nebo s celkovým knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK.

Uspořádání experimentů

Schéma experimentů bylo shodné. Celková doba trvání jednoho experimentu byla 8 týdnů. Myši byly krmeny vysokotukovou dietou (HFD) po dobu 6 týdnů s cílem vyvolat dietou indukovanou obezitu a inzulínovou rezistenci. Poté byla zvířata náhodně rozdělena do dvou skupin. Jedné skupině byla dále podávána vysokotuková dieta a druhé skupině byla podávána vysokotuková dieta s 15% hmotnostním podílem n-3 polynenasycených mastných kyselin EPA a DHA v celkové hmotnosti lipidové složky (HFD+F). Tato intervence trvala 2 týdny. Po uplynutí 8 týdnů byla myším orálně podána jednorázová dávka metforminu (HFD+M, HFD+F+M) nebo fyziologického roztoku (0,9 % NaCl v H₂O) (HFD, HFD+F). Množství podaného metforminu se lišilo u jednotlivých pokusů (tabulka č.). Třicet minut po podání metforminu nebo placebo zvířata podstoupila orální glukózový toleranční test (OGTT) nebo byla usmrcena dislokací krční páteře a co nejrychleji jim byly odebrány vzorky tkání.

Experiment	Myší linie	Genotyp	Pohlaví	Dieta	Dávka metforminu	Odběr tkání / OGTT
1	C57BL/6J	wt	samci	HFD; HFD+F	400 mg/kg	Obojí
2	C57BL/6J	wt	samci	HFD; HFD+F	60 mg/kg	OGTT
3	C57BL/6J	wt; $\alpha 2$ AMPK KO	samice	HFD; HFD+F	60 mg/kg, 30 mg/kg	OGTT

Tabulka č. 3: Přehled provedených experimentů

4.4. Orální glukózový toleranční test (OGTT)

Orální glukózový toleranční test je používán pro diagnostiku inzulínové rezistence a diabetu. Tento test odráží fyziologickou reakci organismu na podání glukózy a hodnotí, jak je organismus schopen se vyrovnat se změnou hladiny glukózy v krvi. Glukóza je myším podána orálně nalačno, přímo do žaludku. Tato aplikace stimuluje výlev GLP-1 a inzulínu. Inzulín postupně snižuje hladinu glukózy v krvi. Podle průběhu utilizace glukózy lze pak určit míru glukózové tolerance a inzulínové citlivosti daného jedince.

Roztoky

- 50% D-glukóza v H₂O
- 0,9% NaCl v H₂O
- roztok metforminu v 0,9% NaCl – koncentrace dle protokolu

Postup

Myši byly den před měřením v 17:30 zváženy a byla jim odebrána potrava. Pro stanovení úbytku hmotnosti přes noc byly ráno opět zváženy, byla jim změřena glykémie nalačno (bazální hladina glukózy) a odebrána krev (cca 100 μ l) pro následné stanovení hladiny inzulínu. Glukometr byl kalibrován dle doporučení výrobce.

Myši byly náhodně rozděleny do dvou skupin. Jedné skupině byl podán metformin dle protokolu a druhé roztok 0,9% NaCl jako placebo. Půl hodiny po podání metforminu nebo placebo byl myším podán 50% roztok glukózy v dávce 3g/kg tělesné váhy. Myším byla měřena glykémie v časových intervalech 15, 30, 60, 90, 120 a 180 min od podání

glukózy. V časovém intervalu 30 minut po podání glukózy byla spolu s měřením odebrána krev do kapilár s EDTA. Ta byla poté použita pro stanovení hladiny inzulínu.

Vyhodnocení

Vyhodnocení glukózového tolerančního testu zahrnuje porovnání bazální hladiny glukózy mezi jednotlivými skupinami a úbytek váhy přes noc. Z hodnot získaných během měření v jednotlivých časech byly vyneseny do grafu takzvané glykemické křivky pro každou skupinu. Hodnoty získané kalkulací plochy pod křivkami jednotlivých skupin (AUC; area under curve) a plochy pod křivkami po odečtení bazálních hladin glukózy (inkrementální AUC; Incremental area under curve) jsou dobrými ukazateli inzulínové citlivosti a schopnosti jednice využít glukózu.

Odběr tkání

Krev byla odebrána do 1,5 ml zkumavky s 5 ul 0,5M EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) z krční tepny a poté byla centrifugována (10 min, 7000 ot/min, 4°C) s účelem separace krevní plazmy, která byla následně odebrána a zmrazena.

Vzorky jater a kosterního svalu *musculus quadriceps femoris* byly odebrány metodou freeze clamp, kdy se tkáň stiskne do kleští předem vychlazených v tekutém dusíku. Tato metoda zabraňuje v co největší možné míře degradaci a defosforylaci proteinů. Vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při -80°C.

4.5. Izolace proteinů

Pro analýzy intracelulárních proteinů metodou western blot, je nutné rozbít buněčné membrány. To lze provést mechanicky (drcením, sonikací) a působením detergentu. K získání extraktu se používá extrakční pufr s obsahem inhibitorů fosfatáz a proteáz, který vytváří stabilní prostředí a zabraňuje degradaci a defosforylaci proteinů.

Extrakční pufr

Deionizovaná H₂O

50 mM Tris

1 mM EDTA

150 mM NaCl

1 mM benzamidin

1 mM DTT

20 mM NaF

2 mM Na pyrofosfát

0,4 mM PMSF

Směs byla filtrována (0,22 µm, Millipore, Německo) a přidány další složky.

0,2 % Triton X-100

1 % glycerol

1 µg/ml aprotinin

1 µg/ml (15 µM) leupeptin

1 µg/ml (15 µM) pepstatin

1 % SERVA fosfatázový inhibitor

Zamražené vzorky tkáně byly drceny v třecí misce spolu s 100 µl extrakčního pufru v tekutém dusíku. Poté byl homogenát sonikován (10 cyklů; 50Hz) a následně centrifugován 18000 g, 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl poté přenesen do čisté zkumavky. Z této zkumavky byly odebrány alikvoty pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku a zbytek byl zamražen v tekutém dusíku.

Stanovení obsahu proteinů ve vzorku metodou BCA

Principem metody BCA (zkratka kyseliny bicinchoninové) je schopnost peptidové vazby redukovat ionty Cu²⁺ na ionty Cu⁺ v alkalickém prostředí. Cu⁺ následně reaguje s kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového produktu s absorpčním maximem 562 nm. Míra absorbance vzorku je přímo úměrná množství proteinů ve vzorku. Výsledné hodnoty jsou získány odečtením z kalibrační křivky, kde byl jako standard použit BSA.

Roztok A: 1 % disodná sůl kyseliny bicinchoninové, 0,4 % NaOH, 2 % Na₂CO₃, 0,16 %
vínan disodná sůl, 0,95 % NaHCO₃

Roztok B: 4 % CuSO₄.5H₂O

Vzorek extraktu byl naředěn vodou dle tkáně tak, aby předpokládaná výsledná hodnota byla v mezích detekce této metody. Vzorek jater byl naředěn 40x a svalů 20x. Nejdříve byla do 96 jamkové destičky napipetována kalibrační řada dle schématu (tabulka č. 4). Měření každého vzorku probíhalo ve dvou rozdílných koncentracích a celé měření bylo provedeno 2x pro získání co nejpřesnějších dat. Reakční směs byla připravena smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 50:1 a ke každému vzorku bylo přidáno 225 µl této směsi. Vzorky byly poté inkubovány 30 min při 37°C. Absorbance vzorků byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm (spektrofotometr Tecan). Jako pozadí reakce (blank) byl použit čistý extrakční pufr. Hodnoty obsahu proteinů ve vzorku byly spočteny dle kalibrační křivky, která byla vytvořena z hodnot absorbance kalibrační řady o známé koncentraci proteinů.

	H ₂ O (µl)	BSA (0,5 mg/ml)	
		(µl)	(µg)
1	20	-	-
2	15	5	2,5
3	10	10	5
4	5	15	7,5
5	0	20	10

Tabulka č.4: Ředění kalibrační křivky

4.6. SDS-gelová elektroforéza

Elektroforéza je analytická metoda používaná k separaci proteinů v elektrickém poli dle jejich molekulové hmotnosti nebo elektrického náboje. Po připojení aparatury ke zdroji napětí se proteiny pohybují v pórovitém gelu. V případě SDS elektroforézy jsou proteiny díky SDS denaturovány a získají všechny stejný povrchový náboj. Rychlost jejich pohybu v gelu je tak dána výhradně jejich molekulovou hmotností. Po definovaném čase se proteiny rozdělí dle molekulové hmotnosti a je možné je izolovat nebo měřit jejich množství.

Roztoky:

30% akrylamid mix

0,2 M akrylamid

3 mM bisakrylamid

Vzorkový pufr

Laemli sample buffer

β -merkaptoethanol

ředění 20:1

Pufr pro elektroforézu (TGS pufr)

25 mM Tris

192 mM glycine

pH 8,3

Složení dělicího 10% SDS - polyakrylamidového gelu (2 gely)

H ₂ O	4,0 ml
------------------	--------

30% akrylamid mix	3,3 ml
-------------------	--------

1.5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
-------------------	--------

10% SDS	0,1 ml
---------	--------

10% APS	0,1 ml
---------	--------

TEMED	0,004 ml
-------	----------

Složení zaostřovacího 5% SDS – polyakrylamidového gelu (2 gely)

H ₂ O	2,1 ml
------------------	--------

30% akrylamid mix	0,5 ml
-------------------	--------

1.0 M Tris pH 6,8	0,38 ml
-------------------	---------

10% SDS	0,03 ml
---------	---------

10% APS	0,03 ml
---------	---------

TEMED	0,003 ml
-------	----------

Příprava vzorků na elektroforézu

Extrakty byly naředěny vodou do požadované koncentrace a poté doplněny vzorkovým pufrem do celkového objemu 20 μ l. Celkově bylo nanášeno do každé jamky 50 μ g proteinu jaterní tkáně a 30 μ g proteinu z extraktu kosterního svalu. Vzorky byly zvortexovány a denaturovány při 85°C po dobu 10 minut v termobloku. Poté byly zchlazeny na ledu, zvortexovány a stočeny.

Postup

Po sestavení aparatury pro nalévání gelů, byly připraveny dělicí 10% polyakrylamidové gely a nality mezi skla. Po jejich ztuhnutí byly převrstveny zaostřovacími 5% gely. Po ztuhnutí obou gelů byly gely přeneseny do aparatury pro elektroforézu. Pro určení přibližné molekulové hmotnosti proteinů byl použit marker (Fermentas, USA) 250-10 kDa. Elektroforéza probíhala cca 30 minut při napětí 60 V a následně 90 minut při napětí 100 V v chladové místnosti.

4.7. Western blot

Western blot je analytická metoda používaná k detekci proteinu specifickými protilátkami. Po rozdělení proteinů dle jejich molekulové hmotnosti elektroforézou je možné je pomocí elektrického pole přenést na povrch speciální membrány. Tuto membránu poté lze inkubovat s protilátkami a kvantifikovat celkové množství hledaného proteinu ve vzorku.

Roztoky:

Pufr I – anodový

150 mM Trizma báze

10% methanol

Pufr II – anodový

12 mM M Trizma báze

10% methanol

Pufr III – katodový

20 mM Tris

5 mM glycin

10% methanol

roztok TBS-T

50 mM Tris

150 mM NaCl

0,05% Tween

pH = 7,6

TBS

50 mM Tris

150 mM NaCl

Blokovací pufr

1 : 1

Odyssey blocking buffer (Li-Cor, USA) : TBS

Roztok pro inkubaci s protilátkami

1,5 ml TBS-T

1,5 ml blokovacího pufru

Postup

Po ukončení elektroforézy byly gely ekvilibrovány po dobu 15 minut v pufru III. PVDF membrána (0,45µm; Millipore, USA) byla inkubována v methanolu po dobu 20 sekund, poté 2 minuty ve vodě a 5 minut v pufru II. Filtrační papíry (Whatman, UK) byly v příslušném počtu ekvilibrovány v pufru I, II nebo III. Po ukončení ekvilibrace gelů byly do aparatury pro polosuché blotování na anodu navrstveny papíry, gel a membrána v tomto pořadí:

6x filtrační papír namočený v pufru I

3x filtrační papír namočený v pufru II

PVDF membrána

gel ekvilibrovaný v pufru III

6 filtračních papírů namočených v pufru III.

Aparatura byla přiklopena katodou a připojena ke zdroji napětí. Přenos probíhal po dobu 1 hodiny při stálém proudu 120 mA v případě přenosu proteinů ze dvou gelů (přenos 0,8mA /cm²) při laboratorní teplotě.

Inkubace s protilátkami

Primární protilátky

Po skončení přenosu byly membrány opláchnuty v 6 ml TBS 5 minut a poté inkubovány v 12 ml blokovacího pufru po dobu 1 h na třepačce při laboratorní teplotě. Poté byl z každé membrány vyříznut proužek s oblastí odpovídající molekulové hmotnosti hledaných proteinů. Tento proužek byl poté inkubován přes noc v roztoku primárních protilátek při teplotě 4°C (tabulka č. 5).

Protein	Protilátka; výrobce	Ředění
Akt	Mouse Anti Pan Akt; R&D systems, UK	1:5000
p-Akt (Thr ³⁰⁸)	Rabbit Anti Phospho-Akt (Thr ³⁰⁸); Cell signalling, USA	1:1000
AMPK	Sheep Anti AMPK α 1 a Sheep Anti AMPK α 2; dar od prof. Hardieho, University of Dundee, UK	1:3500
p-AMPK (Thr ¹⁷²)	Rabbit Anti Phospho AMPK α (Thr ¹⁷²); Cell Signalling, USA	1:1000

Tabulka č. 5: Přehled použitých primárních protilátek

Sekundární protilátky

Další den byla nenavázaná protilátka opláchnuta opakovaným promýváním proužku v TBS-T 5 x 5 minut na třepačce. Poté následovala inkubace v roztoku s roztokem fluorescenčně značených sekundárních protilátek (tabulka 6) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Během inkubace se sekundárními protilátkami byly membrány zakryty hliníkovou folií za stálého míchání na třepačce. Po inkubaci se sekundárními protilátkami byla membrána opět opakovaně opláchnuta TBS-T 5 x 5 minut. Následovalo promytí membrány po dobu 10 minut v TBS.

Protilátka; výrobce	Ředění
IgG Goat Anti Mouse ; Invitrogen, USA	1:5000
IgG Donkey Anti Sheep; Invitrogen, USA	1:5000
IgG Donkey Anti Rabbit; Rockland, USA	1:5000

Tabulka č. 6: Přehled použitých sekundárních protilátek

Detekce

Signál sekundární protilátky na membráně byl detekován na skeneru Odyssey (Li-Cor, USA). Pro detekci byly zvoleny vlnové délky 700 nm a 800 nm, což jsou vlnové délky, při kterých jednotlivé značené sekundární protilátky emitují světlo. Získané snímky byly denzitometricky vyhodnoceny v programu AIDA Image Analyzer. Pro získání porovnatelných hodnot, byly signály vzorků vztaženy na signál vzorku použitého jako standard.

4.8. Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky zpracována v programu SigmaStat 3.5 od firmy (Systat Software, USA). Byla použita jednocestná ANOVA s Holm Sidak post hoc testem (předpoklad normálního rozložení dat). Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jako střední chyby průměru (SE). Hladina signifikance byla stanovena na $p < 0,05$. Grafy byly zpracovány v programu Excel (Microsoft, USA).

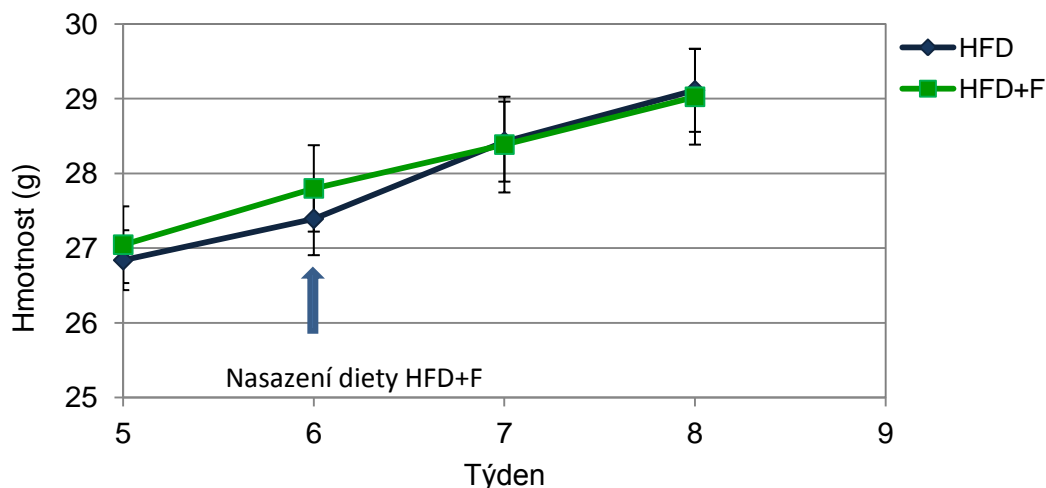
5. Výsledky

5.1. Účinek vysoké dávky metforminu na glukózovou toleranci na pozadí diet HFD a HFD+F

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaký má jednorázové orálního podání vysoké dávky metforminu účinek na glukózovou toleranci inzulin-rezistentního zvířete a jak vysoká dávka metforminu působí na zvířata krmená dietou HFD+F po dobu dvou týdnů.

5.1.1. Nárůst tělesné hmotnosti

Pro navození obezity a inzulinové rezistence byly myši krmeny po dobu 6 týdnů vysokotukovou dietou HFD. V 6. týdnu byla zvířata náhodně rozdělena do dvou skupin. Jedné skupině byla podávána dieta HFD+F (viz. Kap. 3.2. Experimentální diety). Druhá skupina myší byla nadále krmena HFD. Tato dietní intervence trvala 2 týdny. Hmotnost myší byla sledována od 5. týdne konzumace HFD. Obě vysokotukové diety zvýšily tělesnou hmotnost jedinců a mezi skupinami nebyly žádné rozdíly v tělesné hmotnosti (graf 1). Průměrný hmotnostní přírůstek skupiny HFD za 4 týdny, po které byla měřena tělesná hmotnost, byl 2,27 g a hmotnostní přírůstek skupiny HFD+F byl 2,02 g. Příjem potravy se během experimentu mezi skupinami nelišil.

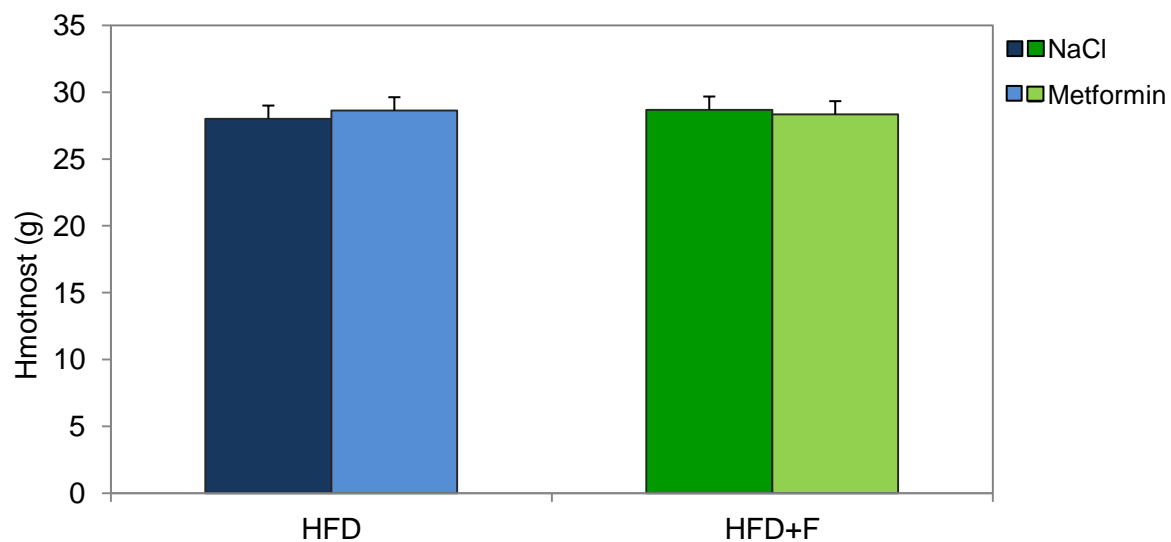


Graf. 1: Průběh nárůstu tělesné hmotnosti během posledních 4 týdnů pokusu. $n=64$, průměr \pm SE.

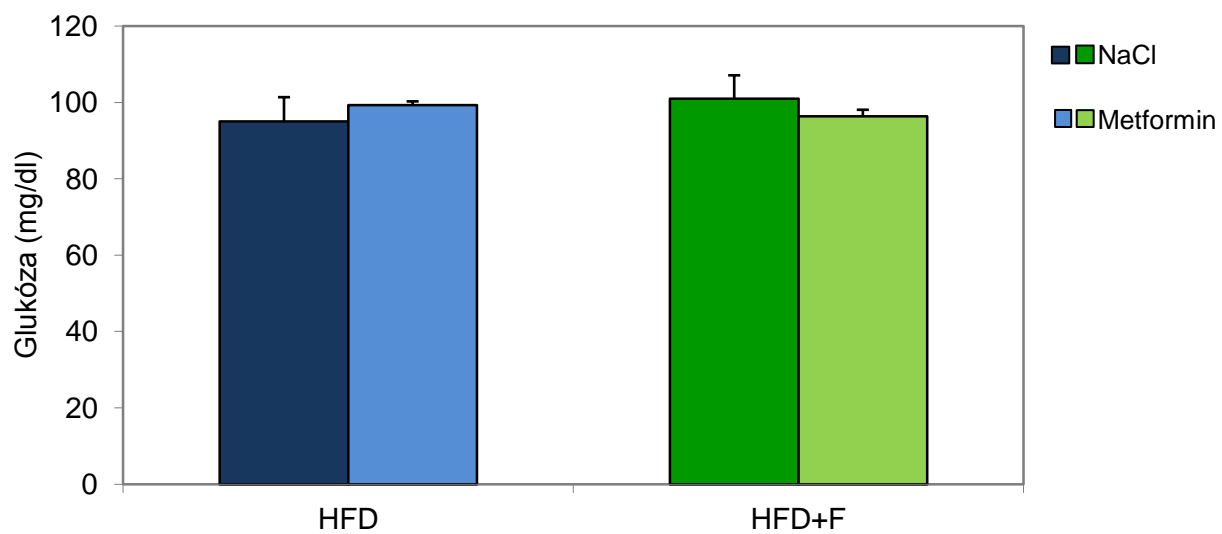
5.1.2. Glukózový toleranční test

Glukózový toleranční test (GTT) byl proveden po 8-mi týdnech krmení experimentálními dietami. Myším byla změřena glykémie nalačno a poté byly rozděleny do dvou skupin, z nichž jedna dostala dávku metforminu (400 mg/kg) a druhá pouze placebo. Po 30-ti minutách byl proveden GTT. Z grafů 2 a 3 je patrné, že před vstupem do testu se hmotnost jednotlivých skupin nelišila (graf 2). Statisticky významné rozdíly nebyly ani v bazální hladině glukózy (graf 3). Z průběhu glykémie během glukózového tolerančního testu (graf 4) jsou patrné rozdíly mezi skupinami, dle toho, zda jim byl podán metformin nebo placebo. Podání vysoké dávky (400 mg/kg) metforminu 30 minut před podáním glukózy signifikantně snížilo glykémii ve 30., 45. a 60. minutě a to u myši krmených HFD i HFD+F. Samotné podávání diety HFD+F 2 týdny před testem také signifikantně snížilo glykémii ve 45. a 60. minutě, ale ne v takové míře jako metformin.

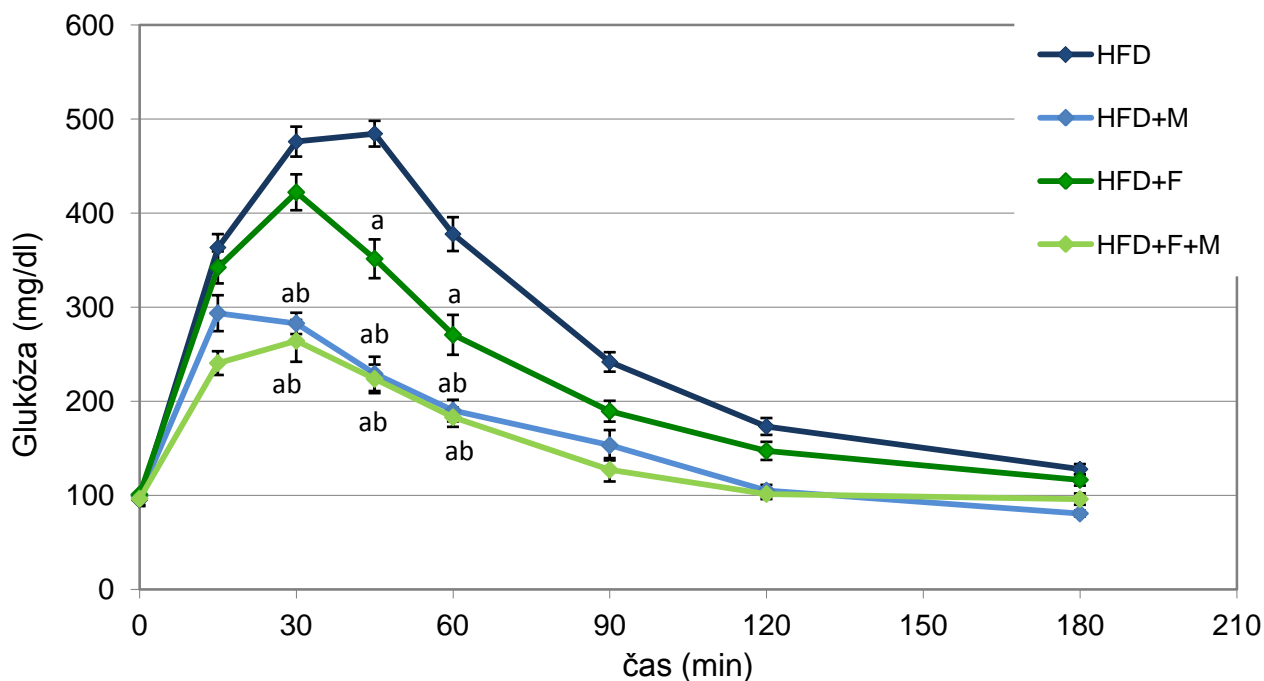
Míru inzulinové rezistence je možné vyjádřit také jako inkrementální nebo celkovou plochu pod křivkou (area under curve – AUC) sestavenou z hodnot glykémie získaných během glukózového tolerančního testu. Podání vysoké dávky (400 mg/kg) metforminu 30 minut před podáním glukózy signifikantně snížilo inkrementální (graf 5) i celkovou (graf 6) AUC u skupiny HFD i HFD+F a to na podobnou hladinu. Mezi skupinami HFD+F a HFD po aplikaci vysoké dávky metforminu nebyly statisticky významné rozdíly. Konzumace HFD+F po dobu 2 týdnů před testem také signifikantně snížila inkrementální i celkovou AUC v porovnání s kontrolní skupinou konzumující HFD, ačkoli ne tolik jako dávka metforminu.



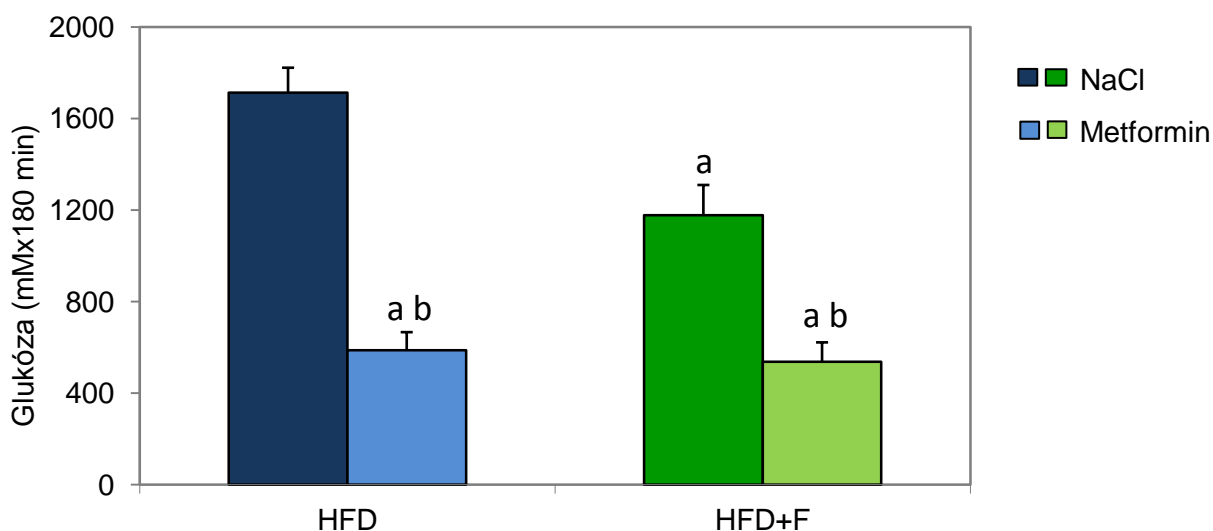
Graf 2: Hmotnost myši před začátkem testu GTT. $n=6$, průměr \pm SE.



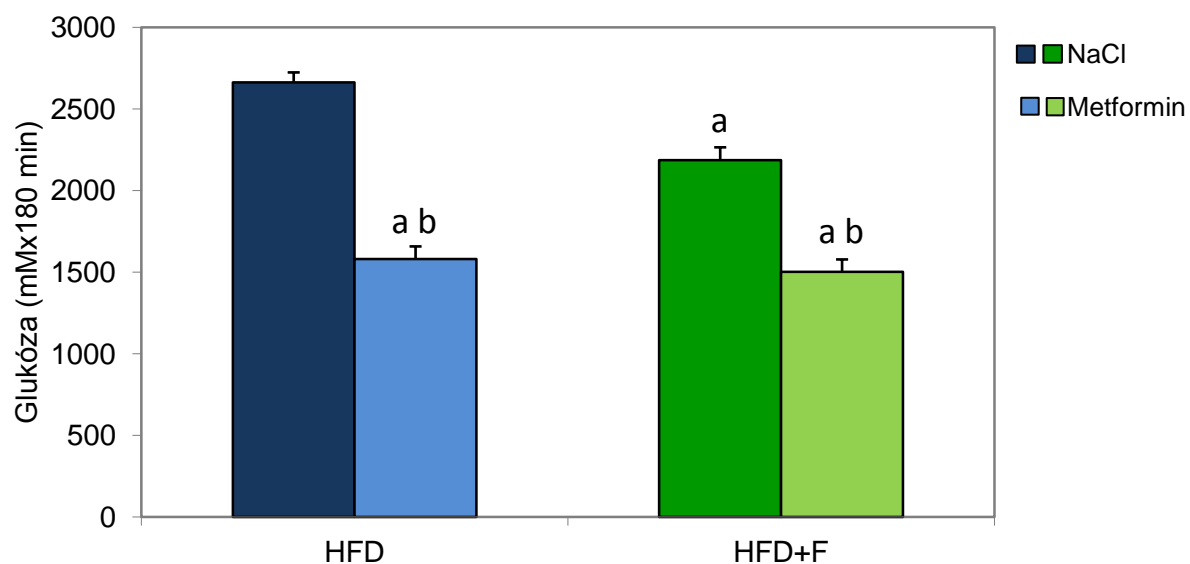
Graf 3 : Bazální hladina glukózy. $n=6$, průměr \pm SE.



Graf 4: Glykémie v průběhu GTT 30 minut po vysoké dávce metforminu. $n = 6$, průměr \pm SE. Statistická analýza: **a** se významně liší od HFD, $p \leq 0,05$; **b** se významně liší od HFD+F, $p \leq 0,05$.



Graf 5: Inkrementální AUC po gaváži vysoké dávky metforminu (400 mg/kg). $n = 6$, průměr \pm SE. **a** se významně liší od HFD, $p \leq 0,05$; **b** se významně liší od HFD+F, $p \leq 0,05$.



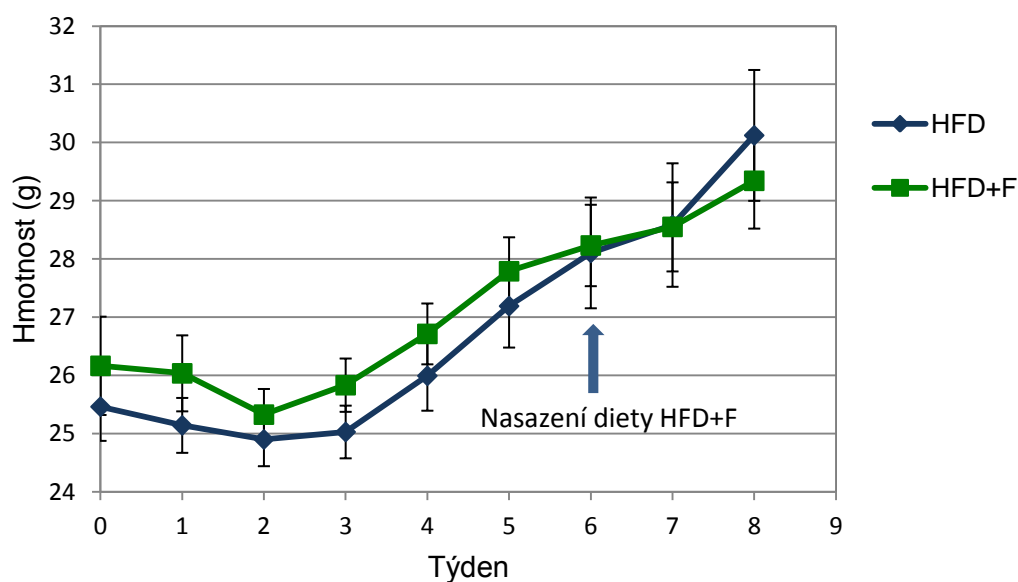
Graf č. 6: Celková AUC po gaváži vysoké dávky metforminu (400 mg/kg). $n = 6$, průměr \pm SE. **a** se významně liší od HFD, $p \leq 0,05$; **b** se významně liší od HFD+F, $p \leq 0,05$.

5.2. Účinek nízké dávky metforminu na glukózovou toleranci na pozadí diet HFD a HFD+F

Cílem bylo zjistit, jaký má jednorázové orálního podání nízké dávky metforminu účinek na glukózovou toleranci inzulín-rezistentního zvířete a jak se na glukózové toleranci projeví krmení dietou HFD+F po dobu dvou týdnů v kombinaci s jednorázovou nízkou dávkou metforminu.

5.2.1. Nárůst tělesné hmotnosti

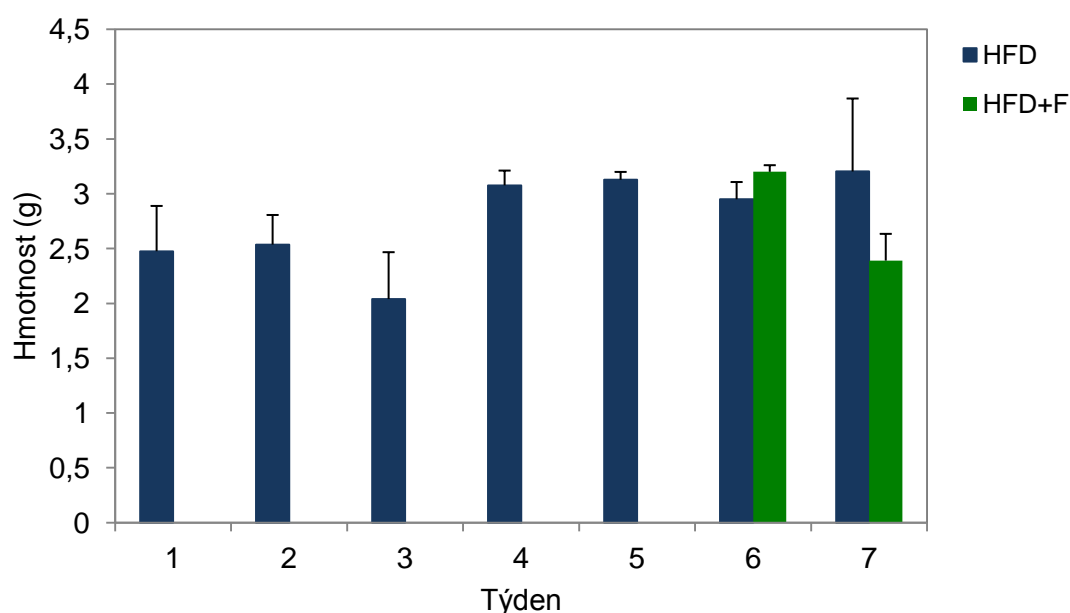
Nárůst tělesné hmotnosti zobrazuje graf 7. Hmotnost byla měřena od 1. týdne experimentu. Skupina krmená HFD zvýšila svou hmotnost průměrně o 4,66 g a skupina krmená HFD+F o 3,18 g. Po nasazení skupiny HFD+F na experimentální dietu v 6. týdnu se hmotnost obou skupin zvyšovala bez signifikantních rozdílů.



Graf 7: Průběh nárůstu tělesné hmotnosti během 8 týdnů pokusu. $n=12$, průměr \pm SE.

5.2.2. Spotřeba diety

Spotřeba diety byla měřena po celou dobu trvání pokusu (graf 8). Sloupce znázorňují průměrnou spotřebu diety jedné myši za 24 hodin. V 8. týdnu spotřeba měřena nebyla, protože byl prováděn GTT. Spotřeba diety, stejně jako tělesná hmotnost, se snížila ve 3. týdnu experimentu pravděpodobně v důsledku stresu z hluku stavebních prací probíhajících v okolí zvěřince. Toto snížení konzumace diety odpovídá sníženému nárůstu hmotnosti ve 3. týdnu. Po nasazení poloviny myši na dietu HFD+F nebyly mezi skupinami prokázány statisticky významné rozdíly. Dva týdny jsou také poměrně krátká doba k ustálení míry konzumace nově podané diety.

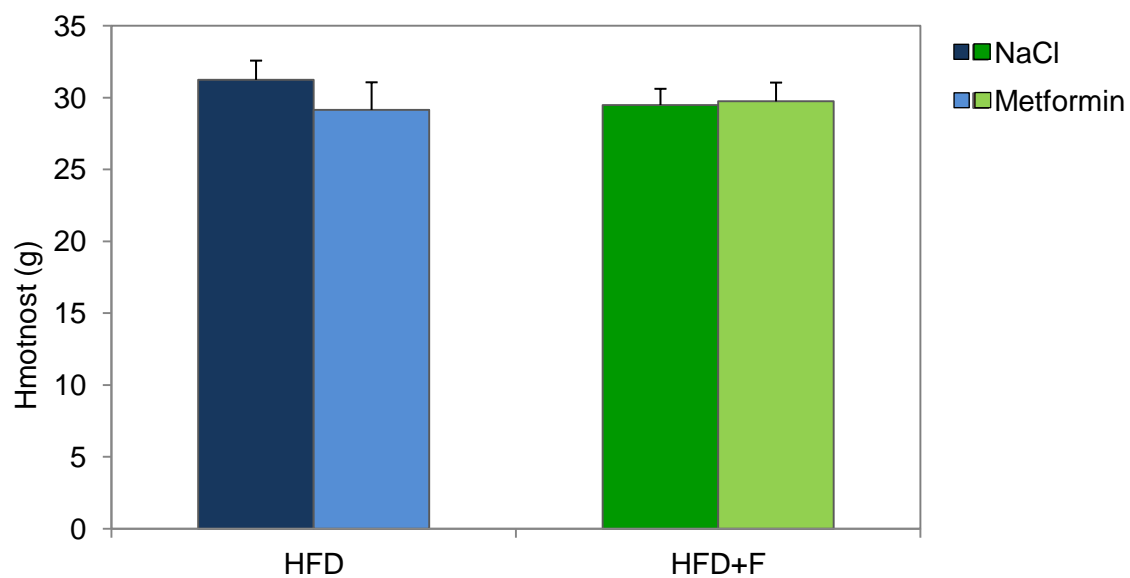


Graf 8: Průměrná spotřeba diety v průběhu pokusu. $n=24$, poté 12, průměr \pm SE.

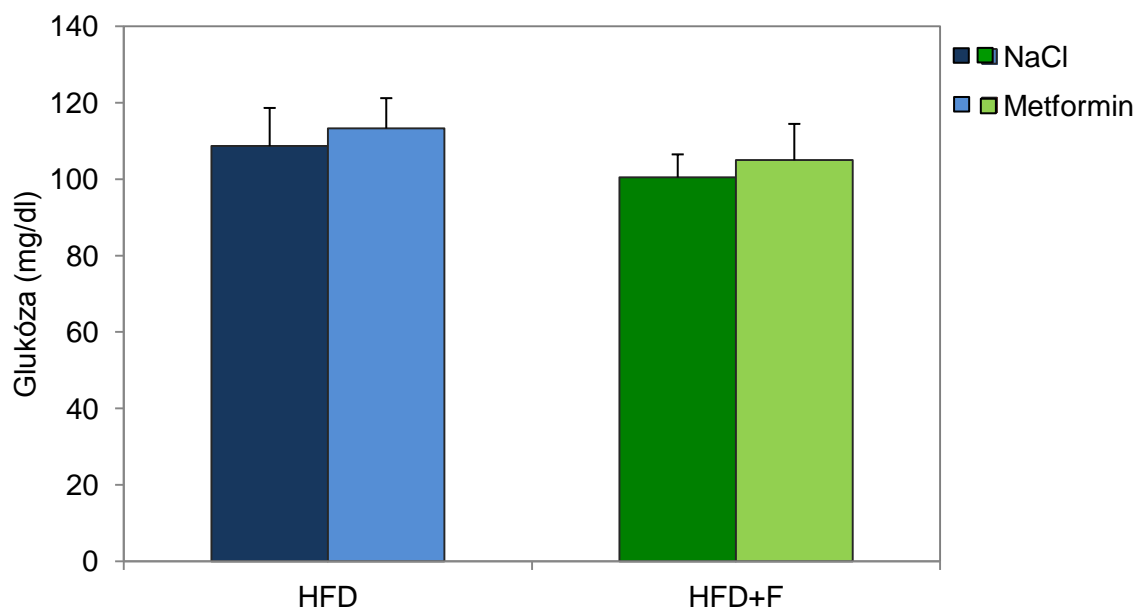
5.2.3. Glukózový toleranční test

Po 8-mi týdnech krmení experimentálními dietami všech 24 zvířat podstoupilo GTT. Před začátkem testu byla stejně jako u předchozího pokusu změřena hmotnost myši a glykémie nalačno po celonočním hladovění. Poté jim byla podána nízká dávka metforminu (60 mg/kg) nebo placebo a 30 minut poté proběhl GTT. Myši vstupovaly do testu s velmi podobnou hmotností bez signifikantních rozdílů (graf 9). Bazální hladina glukózy se před začátkem glukózového tolerančního testu mezi skupinami také signifikantně nelišila (graf 10). V průběhu hodnot glykémie získaných v průběhu glukózového tolerančního testu jsou patrné rozdíly mezi skupinami (graf 11). Podání nízké dávky metforminu (60 mg/kg) 30 minut před podáním glukózy signifikantně snížilo glykémii v 60. minutě u skupiny HFD+F, ale ne u skupiny HFD. Krmení dietou HFD+F po dobu 2 týdnů před testem také signifikantně snížilo glykémii v 60. minutě i pokud nebyl podán metformin.

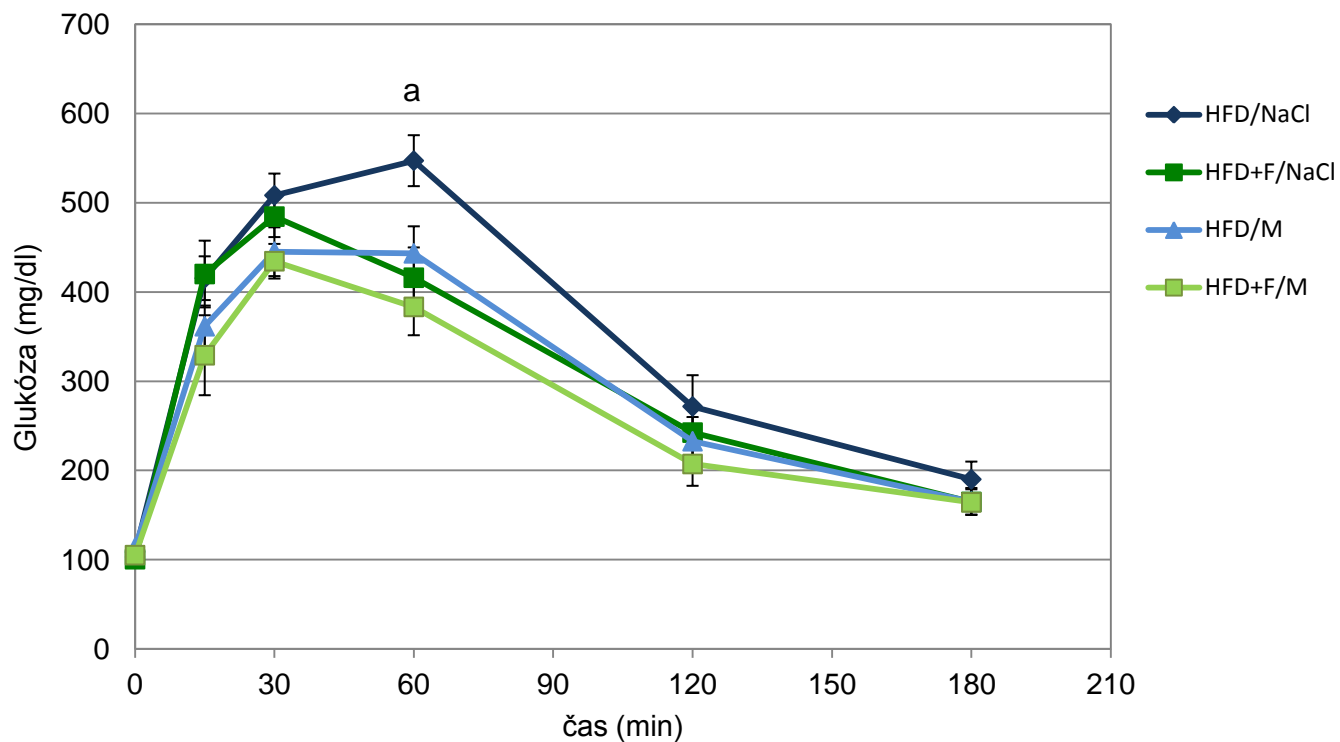
Inkrementální plocha pod křivkou, pomocí které lze vyjádřit míru inzulínové rezistence, byla signifikantně snížena u skupiny HFD+F, které byl podán metformin v porovnání s kontrolní skupinou (graf 12). U skupiny HFD podání metforminu nezpůsobilo signifikantní pokles hodnoty inkrementální AUC. Dieta HFD+F snížila inkrementální plochu pod křivkou, ale rozdíl nebyl signifikantní. Mezi celkovými plochami pod křivkou nebyly žádné signifikantní rozdíly (graf 13)



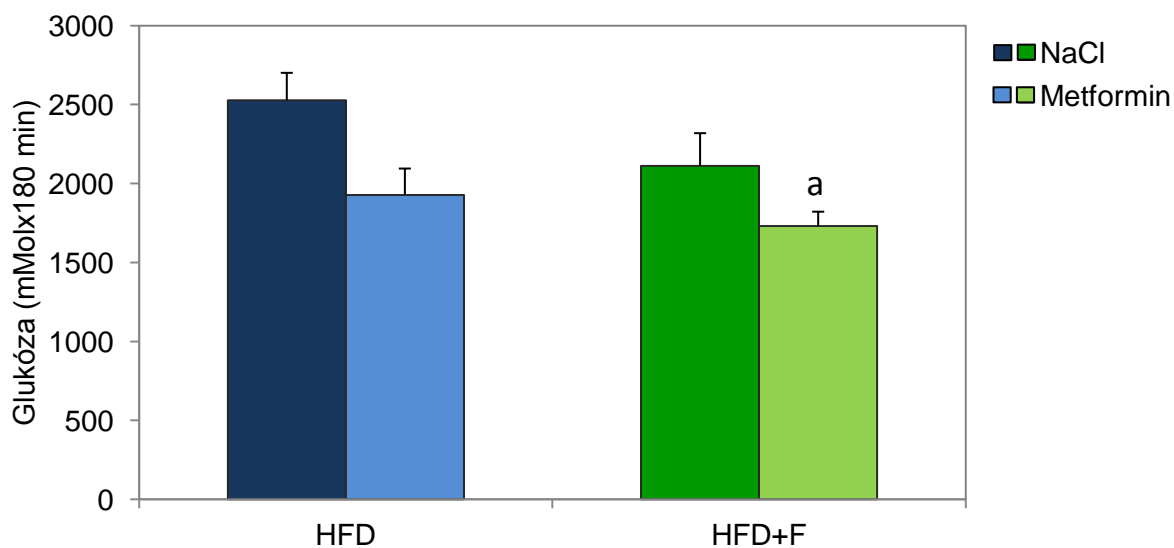
Graf 9: Hmotnost myši před začátkem GTT. $n=6$, průměr \pm SE.



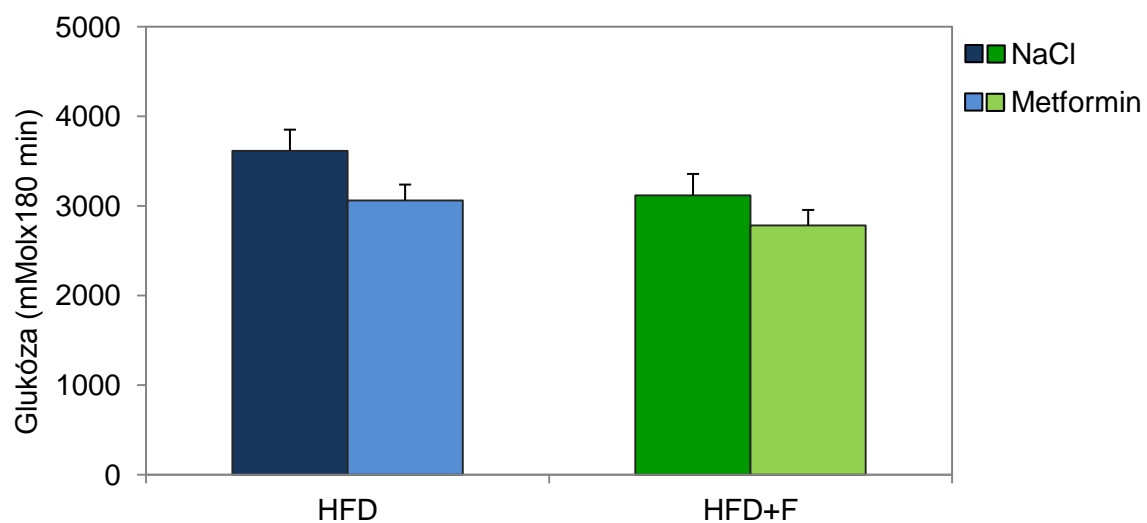
Graf 10: Bazální hladina glukózy. $n=6$, průměr \pm SE.



Graf 11: Glykémie v průběhu GTT 30 minut po nízké dávce metforminu (60 mg/kg). $n=6$, průměr \pm SE. **a** se signifikantně liší od HFD+F+M a HFD+F, $p \leq 0,05$.



Graf 12: Inkrementální AUC 30 minut po podání nízké dávky metforminu (60 mg/kg). $n=6$, průměr \pm SE. **a** se signifikantně liší od HFD, $p \leq 0,05$.



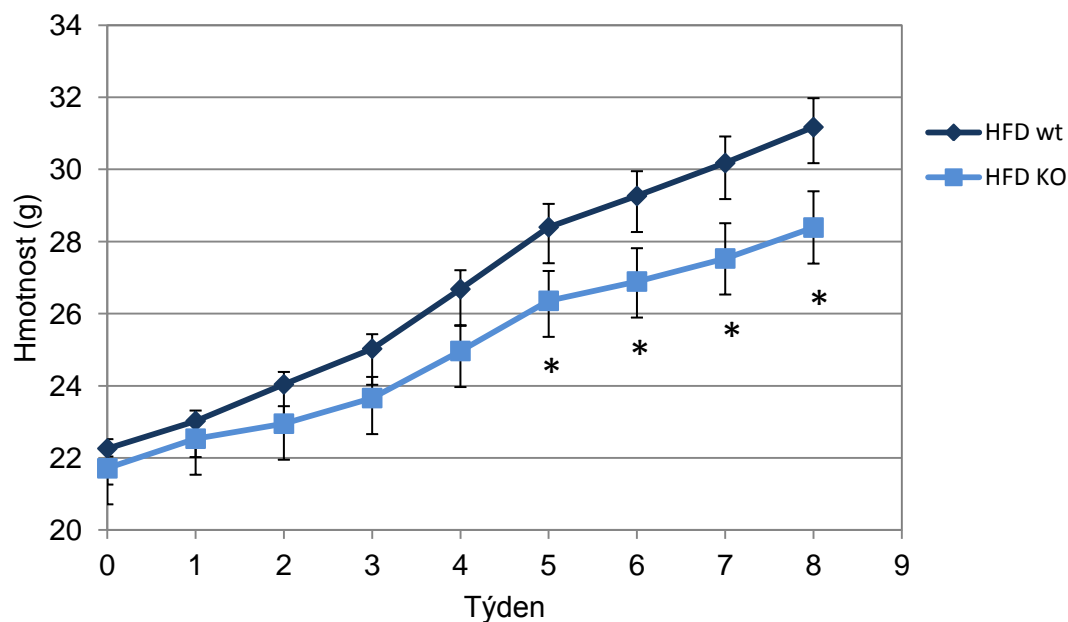
Graf 13: Celková AUC 30 minut po podání nízké dávky metforminu (60 mg/kg). $n = 6$, průměr \pm SE.

5.3. Účinek nízké dávky metforminu na glukózovou toleranci myši s celotělovým knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK.

Cílem bylo zjistit, jaký má jednorázové orálního podání dvou různých nízkých dávek metforminu účinek na glukózovou toleranci inzulín-rezistentního zvířete s celotělovým knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK.

5.3.1. Nárůst tělesné hmotnosti

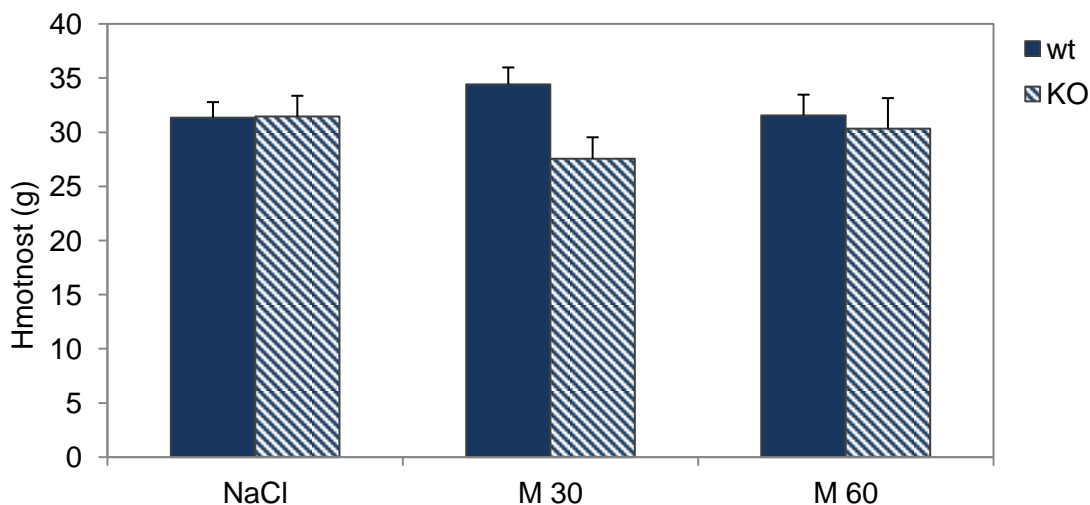
Nárůst tělesné hmotnosti zobrazuje graf 14. Hmotnost skupiny HFD se po 8 týdnech aplikace diety zvýšila průměrně o 8,91 g. Myši s knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK vážily po celou dobu experimentu méně a ačkoli se jejich hmotnost při konzumaci diety HFD také zvyšovala, už od 5. týdne byla jejich hmotnost signifikantně nižší než hmotnost kontrolní skupiny. Jejich průměrný hmotnostní přírůstek za 8 týdnů byl 6,68 g. Konzumaci diety jednotlivých genotypů v průběhu pokusu nebylo možné měřit, protože myši byly chovány po víc jedincích různých genotypů



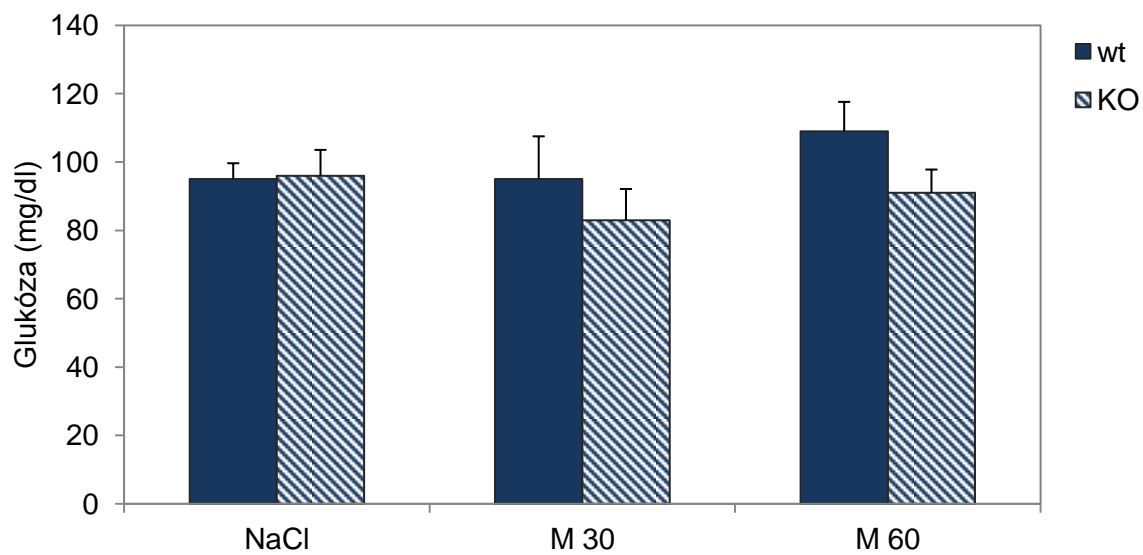
Graf 14: Průběh nárůstu tělesné hmotnosti. $n=25$, průměr \pm SE

5.3.2. Glukózový toleranční test

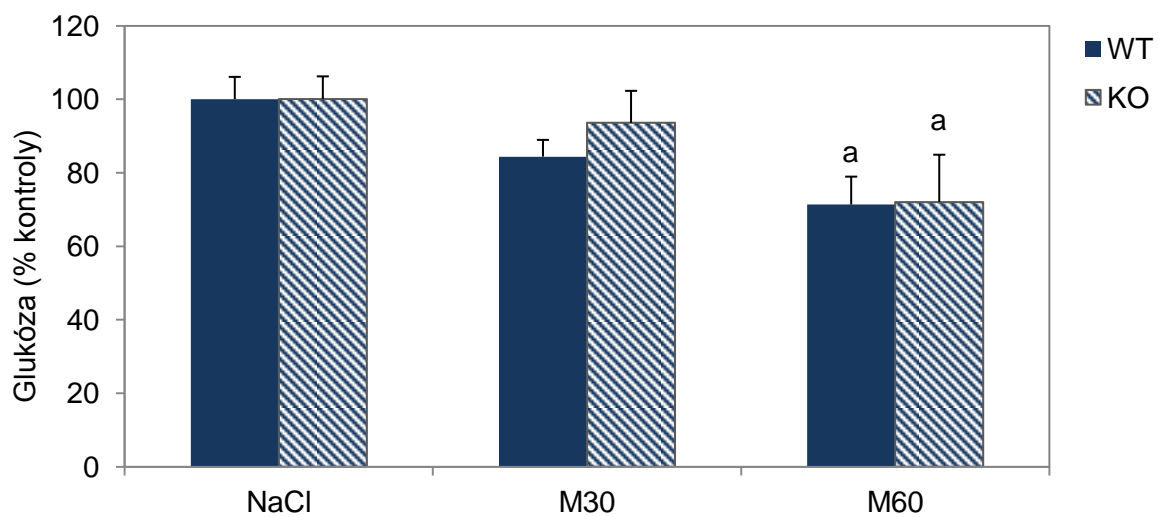
Glukózový toleranční test podstoupilo po 8-mi týdnech krmení experimentálními dietami všech 50 myší. Myši byly nejprve rozděleny do skupin dle genotypu a dávky metforminu nebo placebo tak, aby se jejich hmotnosti lišily co nejméně. Zvířatům byla změřena glykémie nalačno po celonočním (cca 15 h) hladovění. Myším poté bylo podáno jednorázově placebo nebo metformin v dávce 60 mg/kg (M 60) nebo 30 mg/kg (M 30) a 30 minut poté podstoupily GTT. Hmotnost myší se před vstupem do testu signifikantně nelišila (graf 15). Bazální hladina glukózy se před začátkem GTT signifikantně nelišila (graf 16). Glukózový toleranční test byl vyhodnocen prostřednictvím celkové a inkrementální AUC. Vzhledem k tomu, že myši skupin KO vykazovaly v průběhu GTT vyšší hodnoty než myši kontrolní, byly hodnoty AUC skupin, které dostaly placebo, vyjádřeny jako 100% a z těch bylo poté určeno, jakého podílu dosáhla AUC skupin M 30 a M 60 (grafy 17 a 18) pro zobrazení, jak metformin působil na glukózovou toleranci. Jednorázově podaný metformin v dávce 60 mg/kg signifikantně snížil inkrementální a celkovou AUC u skupin KO M60 i WT M60 v porovnání se skupinou KO NaCl. Metformin v dávce 30 mg/kg také snížil inkrementální a celkovou AUC, ale rozdíl nebyl signifikantní.



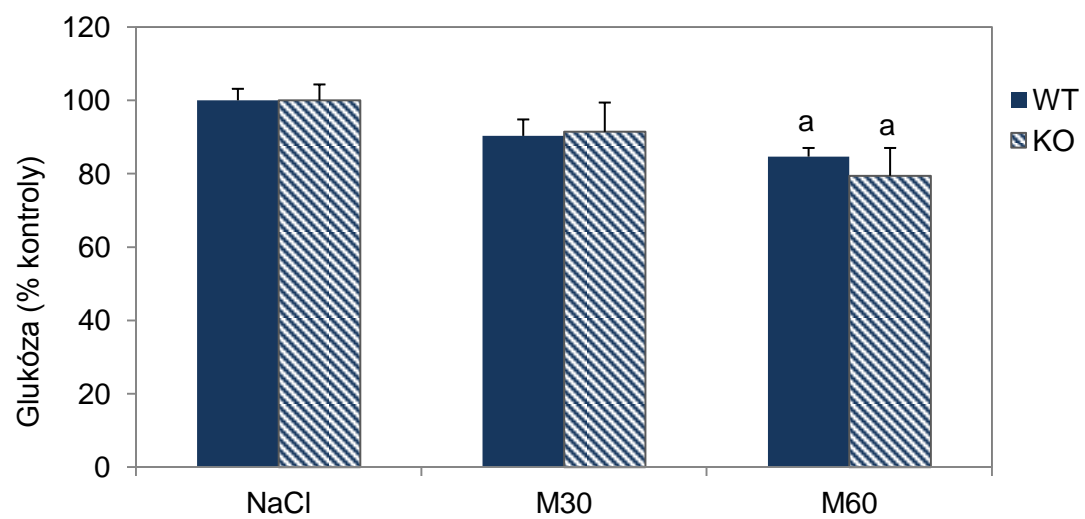
Graf 15: Hmotnost myší před začátkem testu GTT, $n=6$, průměr \pm SE.



Graf 16: Hladina glukózy na lačno. $n=6$, průměr \pm SE.



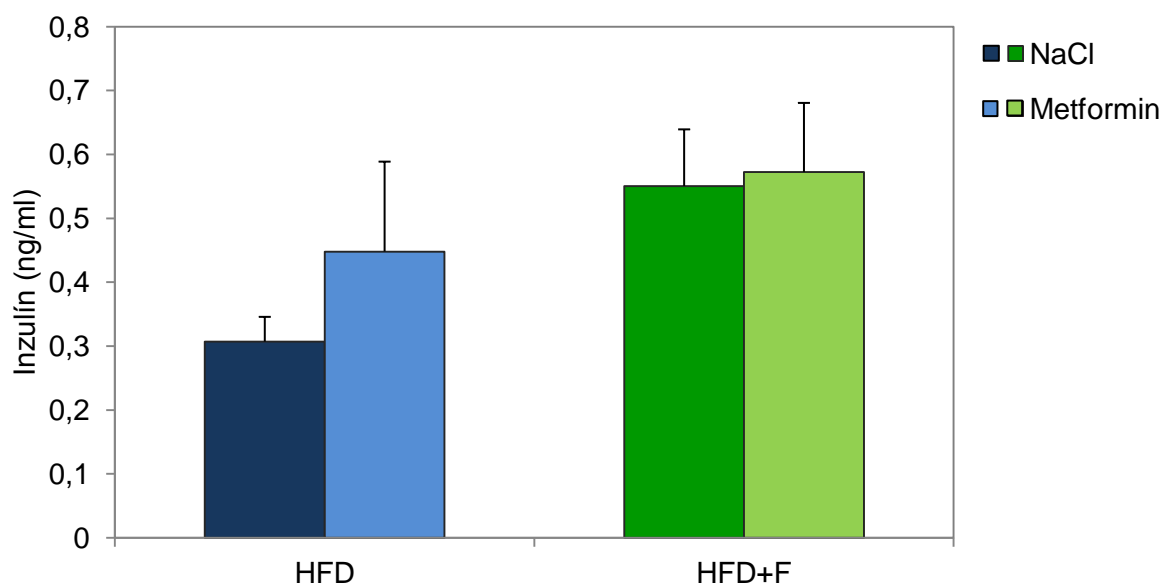
Graf 17: Inkrementální AUC. $n=8$, průměr \pm SE. *a* se signifikantně liší od skupiny KO NaCl, $p \leq 0,05$.



*Graf 18: Celková AUC. $n=8$, průměr \pm SE. *a* se signifikantně liší od skupiny KO NaCl, $p \leq 0,05$.*

5.4. Účinek vysoké dávky metforminu a n-3 PUFA na sekreci inzulínu po podání glukózy

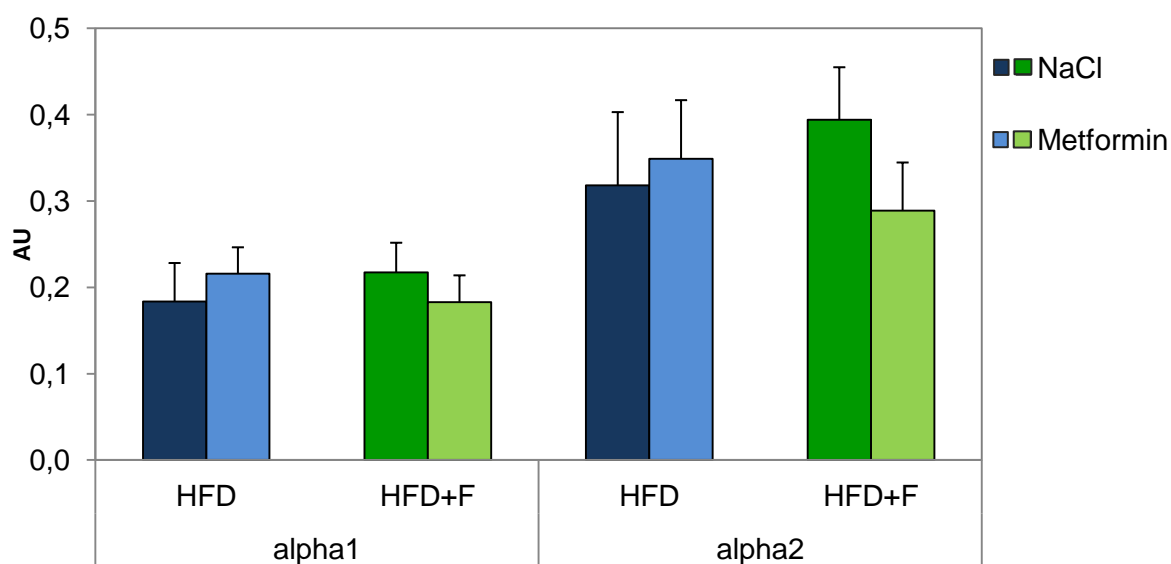
Pro zjištění, zda metformin nebo n-3 PUFA zlepšují glukózovou toleranci prostřednictvím zvýšení sekrece inzulínu, byla v plazmě odebrané nalačno a v čase 30 minut stanovena hladina inzulínu metodou radioimunoesej (RIA). Tyto výsledky jsou vyjádřeny jako nárůst hladiny inzulínu 30 minut po podání glukózy. Hladina inzulínu v plazmě se 30 minut po podání glukózy zvýšila u všech skupin, a to v podobné míře (graf 19). Mezi skupinami nebyly statistickou analýzou zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami. Obě skupiny krmené dietou obohacenou o n-3 PUFA (HFD+F, HFD+F+M) však vykazují trend k vyššímu nárůstu hladiny inzulínu po podání glukózy než kontrolní skupina (HFD).



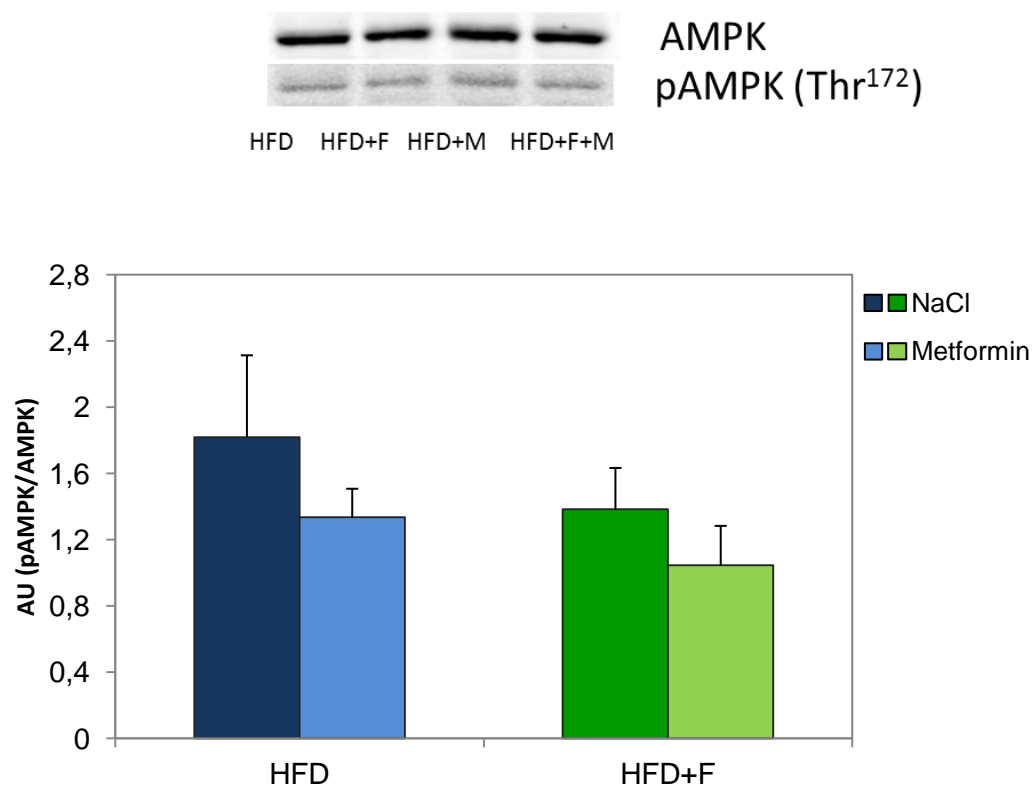
Graf 19: Rozdíl v hladinách inzulínu nalačno a 30 minut po podání glukózy. $n = 6$, průměr $\pm SE$.

5.5. Účinek vysoké dávky metforminu a n-3 PUFA na aktivitu AMPK v játrech a kosterním svalu

V extraktech z jaterní tkáně byla přímo měřena aktivita izoformem katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2) (graf 20). Stanovení enzymové aktivity (kinázová esej) AMPK zahrnovalo enzymovou reakci, při které proběhla fosforylace uměle nasyntetizovaného peptidu prostřednictvím AMPK. Mezi aktivitou podjednotky α 1AMPK v játrech 30 minut po podání metforminu nebyly mezi skupinami nalezeny žádné rozdíly. Ani aktivita podjednotky α 2 AMPK se mezi skupinami statisticky významně nelišila. Aktivace AMPK byla měřena v kosterním svalu *musculus quadriceps femoris* 30 minut po aplikaci jedné dávky metforminu prostřednictvím stanovení relativního poměru celkového a fosforylovaného množství AMPK metodou western blot (graf 21). Jednorázová dávka metforminu (400 mg/kg) nevyvolala signifikantní změnu v aktivaci AMPK mezi skupinami.



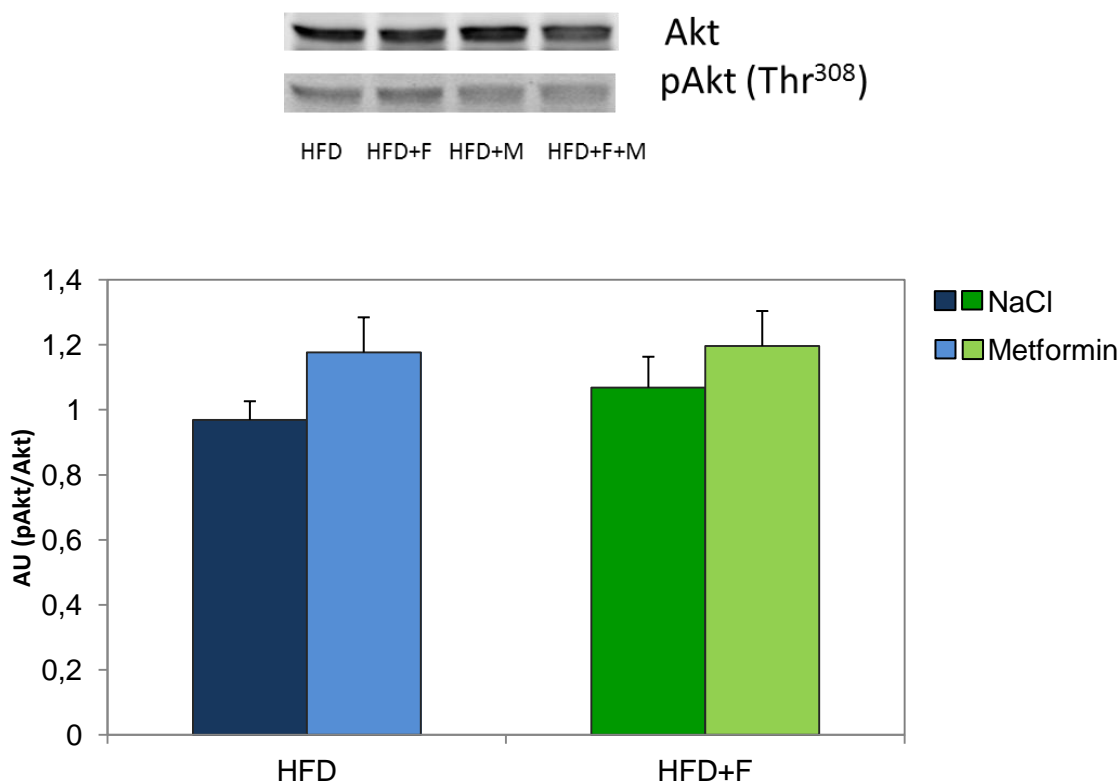
Graf 20: Aktivita podjednotek α 1 a α 2 jaterní AMPK 30 minut po podání metforminu. $n = 7$, průměr \pm SE



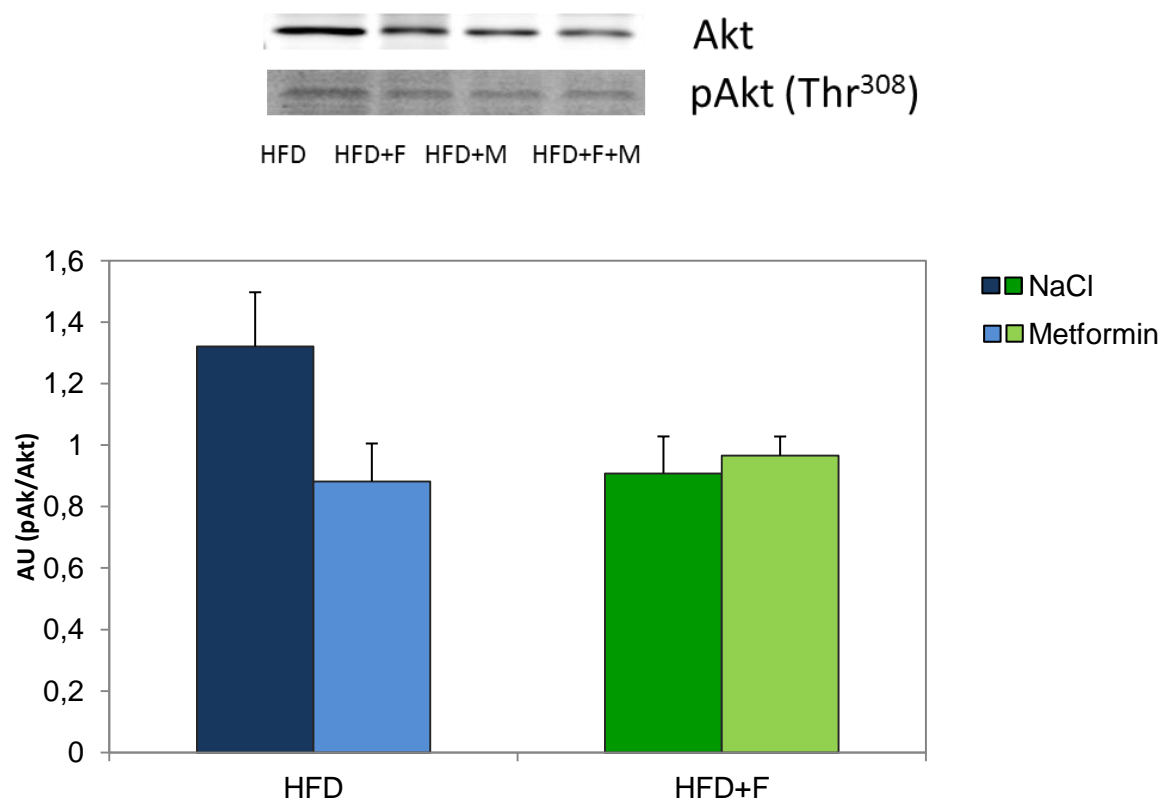
Graf 21: Relativní poměr fosforylované a celkové formy AMPK ve vzorcích kosterního svalu. Nahoře obrázek membrány. $n=7$, průměr \pm SE.

5.6. Účinek vysoké dávky metforminu a diety HFD+F na aktivitu Akt/PKB v játrech a kosterním svalu

Metodou western blot byla měřena míra aktivace Akt/PKB v extraktech z jaterní tkáně a kosterního svalu *quadriceps femoris*. Míra aktivace Akt byla získána porovnáním množství celkové a fosforylované Akt/PKB na Thr³⁰⁸, jehož fosforylace je zásadní pro přenos inzulinového signálu. V extraktech jaterní tkáně nebyly po jednorázové aplikaci vysoké dávky metforminu zjištěny statisticky významné rozdíly v poměru fosforylované formy mezi jednotlivými skupinami (graf 22). Ani v extraktech z kosterního svalu nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v míře aktivace Akt/PKB po jednorázové aplikaci vysoké dávky metforminu (graf 23).



Graf č. 22: Relativní poměr fosforylované a celkové Akt/PKB v játrech. Nahoře snímek membrány s proteiny. $n = 7$, průměr \pm SE.



Graf č. 23: Relativní poměr fosforylované a celkové Akt/PKB v kosterním svalu. Nahoře snímek membrány s proteiny. $n = 7$, průměr \pm SE.

6. Diskuze

Metformin je nejčastěji předepisovaným lékem pacientům s diabetem 2. typu. Tento preparát snižuje glykémii prostřednictvím inhibice jaterní glukoneogeneze a zvýšení citlivosti kosterního svalu k inzulínu (Bosi, 2009). Do této chvíle bylo provedeno jen málo experimentů, zaměřujících se na akutní ovlivnění glukózové homeostázy metforminem. Metformin je považován za aktivátor AMPK a předpokládá se, že jeho účinky jsou touto kinázou zprostředkovány (Zhou *et al.*, 2001). Byly ovšem provedeny i experimenty, které prokázaly, že existují i mechanismy na AMPK nezávislé (Foretz *et al.*, 2010). n-3 PUFA, které mají na metabolismus prediabetického jedince příznivý vliv, působí zejména prostřednictvím ovlivnění transkripčních faktorů v tukové tkáni a játrech (Stienstra *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 2005), ale také byla potvrzena aktivace AMPK v některých tkáních (Lorente-Cebrián *et al.*, 2009; Suchankova *et al.*, 2005). Cílem této práce bylo charakterizovat časný účinky metforminu na glukózovou toleranci v kombinaci s podáváním n-3 PUFA u myši se zhoršenou inzulínovou citlivostí.

Uspořádání experimentu

V rámci experimentu byly provedeny tři testy glukózové tolerance s použitím různých dávek metforminu. V jednom pokusu byl také použit transgenní model s celotělovou deficiencí $\alpha 2$ podjednotky AMPK. Pro experiment byly použity myši kmene C57BL/6J. Tento kmen je vhodným modelem, protože je velmi náchylný k rozvoji dietou indukované obezity a inzulínové rezistence. Pokud jsou ale myši krmeny standardní dietou, žádné patologie se u nich nerozvíjí. V naší laboratoři je tento kmen dobře charakterizovaným modelem. V souladu s literaturou (Wang a Liao, 2012) došlo po 6-ti týdnech podávání vysokotukové diety u myši ke zhoršení glukózové tolerance a rozvoji inzulínové rezistence. Následné dvoutýdenní podávání diety s 15% podílem n-3 PUFA (konkrétně EPA a DHA) v celkové lipidové složce (HFD+F) po dobu dvou týdnů bylo zvoleno jako krátkodobá dietní intervence, která může zlepšit metabolismus inzulín-rezistentního jedince. Bylo prokázáno, že dva týdny podávání této diety stačí navození

změn metabolismu, konkrétně snížení míry chronického zánětu v tukové tkáni (Jilkova *et al.*, 2013). V našem pokusu 8 týdnů podávání vysokotukové diety zvýšilo hmotnost myši ve všech experimentech. Po nasazení myši na experimentální dietu HFD+F se neprojevily v hmotnostech myši ani v konzumaci diety rozdíly. Například v experimentu č. 3 se průměrná hmotnost za 8 týdnů konzumace vysokotukové diety zvýšila o 42%. Myši s knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK na váze přibýly výrazně méně a to o 31%. Rozdíl v hmotnosti mohl být způsoben rozdílnou konzumací diety, ale toto není možné ověřit, protože myši byly chované v klecích po více jedincích obou genotypů. Dle publikace, kde byly použité stejné myši, se ale konzumace diety HFD mezi kontrolními a $\alpha 2$ AMPK KO jedinci nelišila (Jelenik *et al.*, 2010).

Glukózová tolerance byla testována glukózovým tolerančním testem. Orální glukózový toleranční test byl zvolen proto, že představuje nejfyziologičtější cestu vstupu glukózy do organismu. Glukóza je zavedena do žaludku a její postup trávicím traktem zahrnuje výlev inkretinů i aktivaci mozkových drah spojených s příjmem potravy. Průběh testu tak odráží celkovou reakci organismu na podání glukózy. Celonoční hladovění před testem indukuje u myši katabolický stav, protože myši konzumují potravu zejména v noci. Zásoby glykogenu v játrech jsou tak vyčerpány a zároveň dojde ke snížení variability v hodnotách bazální glykémie (Ayala *et al.*, 2010).

Účinek metforminu a n-3 PUFA na glukózovou toleranci

Výsledky našich experimentů jasně prokazují, že jednorázové podání vysoké dávky metforminu (400mg/kg) dramaticky zlepšuje glukózovou toleranci 1 hodinu po aplikaci. Jednorázově podaná dávka metforminu 30 minut před podáním glukózy signifikantně snížila glykémii a to o 40% v 30. minutě, 53% ve 45. minutě, 50% v 60. minutě a 37% v 90. minutě. Míra snížení glykémie oproti kontrolní skupině dokonce odpovídá míře snížení glykémie, jaká byla pozorována v průběhu OGTT po 9 týdnech chronického podávání metforminu v dávce cca 312 mg/kg tělesné váhy/den, která byla konkrétně o 42% ve 30. minutě a 57% v 60. minutě (Matsui *et al.*, 2010).

Skupina HFD+F, které nebyl podán metformin, vykazovala výrazně lepší odpověď na dávku glukózy než kontrolní skupina HFD. Ve 45. a 60. minutě byla glykémie snížena oproti kontrolní skupině skoro o 30%. To ukazuje, že i pouhé dva týdny podávání diety, kde je 15% lipidů nahrazeno koncentrátem n-3 PUFA (konkrétně EPA a DHA) dokáže významně zlepšit glukózovou toleranci. n-3 PUFA stimulují výlev adiponektinu, hormonu s inzulin-senzitizujícím účinkem, z tukové tkáně (Flachs *et al.*, 2006) a zabraňují zhoršení inzulinové signalizace důsledkem rozvoje obezity (Tishinsky *et al.*, 2012). Toto může vysvětlovat naše výsledky, kde samotné podávání diety HFD+F významně zlepšilo glukózovou toleranci oproti kontrolní skupině. Odpověď organismu na dávku glukózy odráží také hodnoty inkrementální AUC, kde je jasně patrné, že metformin významně zlepšil celotělovou glukózovou toleranci. Podání metforminu u skupin HFD i HFD+F snížilo inkrementální AUC a to o 66% resp. 69%. Samotná dieta HFD+F také signifikantně snížila inkrementální AUC oproti kontrolní skupině a to o 32 %.

Možný účinek n-3 PUFA byl v případě podání vysoké dávky metforminu maskován výrazným snížením glykémie metforminem, proto byl proveden test se sníženou dávkou metforminu (60 mg/kg). Podání nízké dávky metforminu (60 mg/kg) také snížilo glykémii myši v průběhu GTT, signifikantní rozdíl byl prokázán pouze v 60. minutě testu, avšak glykémie byla v porovnání s kontrolní skupinou nižší po celou dobu testu. Experiment tak ukázal, že metformin zlepšuje glukózovou toleranci v závislosti na dávce i při pouhém jednorázovém podání tohoto preparátu.

Stejně jako v experimentu s vysokou dávkou metforminu, také v tomto pokuse se ukázalo, že podíl n-3 PUFA v dietě dokáže efektivně zlepšovat glukózovou toleranci. Signifikantní rozdíl mezi hodnotami AUC byl nalezen pouze mezi skupinami HFD+F+M a HFD, což ukazuje, že n-3 PUFA mohou potencovat účinek metforminu na glukózovou toleranci. Efekt n-3 PUFA na účinek metforminu nebyl potvrzen jednoznačně, protože mezi skupinami, kterým byl podán metformin nebyly nalezeny signifikantní rozdíly. V každém testu byl nicméně patrný trend, kdy glykémie či AUC skupiny HFD+F+M byla vždy nižší než HFD+M a to průměrně o 5%. Synergistický účinek metforminu a n-3 PUFA by mohl spočívat v aktivaci AMPK nebo selektivní kontrole aktivity izoforem PKC. Metformin

stimuluje aktivitu aPKC v játrech (Sajan *et al.*, 2013) a PKC θ v kosterním svalu (Turban *et al.*, 2012). n-3 PUFA naopak inhibují aktivaci aPKC v hepatocytech (Neurnberg *et al.*, 2011) a aktivují PKC θ v kosterním svalu (Lombardo *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že metformin a n-3 PUFA působí na PKC v těchto tkáních velmi specificky, možný synergistický efekt by mohl probíhat prostřednictvím selektivní regulace aktivity izoform PKC.

Význam $\alpha 2$ podjednotky AMPK v akutním účinku metforminu na glukózovou homeostázu

α podjednotka AMPK je v organismu exprimována ve dvou izoformách, $\alpha 1$ a $\alpha 2$. Výskyt jednotlivých izoform je tkáňově specifický. Izoforma $\alpha 1$ se ve větší míře nachází v adipocytech a erytrocytech, zatímco izoforma $\alpha 2$ je dominantní v kosterním svalu, srdci a hypothalamu. Exprese obou podjednotek je přibližně stejná v játrech (Hardie, 2007). $\alpha 2$ podjednotka AMPK je velmi důležitá pro celotělovou inzulinovou citlivost, zatímco $\alpha 1$ podjednotka nemá na glukózovou homeostázu tak zásadní vliv. Myši s chybějící $\alpha 2$ podjednotkou AMPK vykazují vysokou glykémii po příjmu potravy či podání glukózy a zhoršenou sekreci inzulinu, zatímco myši s knockoutem podjednotky $\alpha 1$ žádný defect v glukózové toleranci nevykazují (Viollet *et al.*, 2003). Pro zjištění, je-li pro akutní účinek metforminu na celotělovou glukózovou toleranci nezbytná $\alpha 2$ podjednotka AMPK, jsme provedli experiment s použitím myši s celotělovým knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK.

Hmotnost myši se na počátku testu lišila a $\alpha 2$ AMPK KO skupina vážila v průměru signifikantně méně už od 5. týdne. V souladu s literaturou (Viollet *et al.*, 2003) $\alpha 2$ AMPK KO skupina vykazovala inzulinovou rezistenci i při nižší hmotnosti, jak bylo patrné z hodnot glykémie v průběhu GTT. Účinek metforminu na glukózovou toleranci myši s deficientní $\alpha 2$ podjednotkou AMPK tak nebyl zkreslen rozdílnou hmotností obou skupin.

Myším byly podány dvě dávky metforminu (60 mg/kg a 30 mg/kg) nebo placebo. Vzhledem k tomu, že myši s knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK vykazovaly během GTT

odlišné hodnoty než kontrolní skupina, byly výsledky byly vyjádřeny jako procentuální podíl hodnoty AUC kontrolní skupiny, pro zobrazení účinku metforminu. V případě inkrementální i celkové AUC se prokázalo, že metformin v dávce 60 mg/kg signifikantně snížil AUC a tedy i glykémii v průběhu GTT u kontrolních i AMPK α 2 KO myší a to v podobné míře, konkrétně o 29%, resp. 28%. Dávka metforminu (30 mg/kg) také snížila AUC u kontrolních i AMPK α 2 KO myší (o 16% a 6%), rozdíl však nebyl signifikantní. Je zde jasně patrný vztah dávka-odpověď, což potvrzuje, že časný účinek metforminu na glukózovou toleranci v časovém období 30 minut až 3 hodiny, je nezávislý na katalytické podjednotce α 2 AMPK v rámci celého organismu. Tyto pozorování rozšiřují dosavadní výsledky (Foretz *et al.*, 2010) a ukazují, že metformin účinně zlepšuje glukózovou toleranci nezávisle na podjednotkách α 1 i α 2 jaterní AMPK po jednorázové aplikaci metforminu (v dávkách 300 mg/kg, 150 mg/kg). V případě dávky 50 mg/kg nebyl rozdíl v AUC signifikantní, jako v případě našeho pokusu, ale také došlo ke snížení glykémie ve všech měřených časech. V této publikaci byly použity myši s knockoutem α 1 i α 2 podjednotky AMPK v játrech (Foretz *et al.*, 2010). Naše výsledky s použitím myší s celotělovou deficiencí α 2 podjednotky AMPK rozšiřují dosavadní informace o akutním účinku metforminu v rámci celého organismu a potvrzují, že ani funkčnost α 2 podjednotky AMPK v ostatních tkáních není nutná pro akutní účinek metforminu na glukózovou toleranci. Přesto by se AMPK na efektu metforminu na glukózovou toleranci mohla podílet, a proto byla změřena aktivita AMPK v játrech a kosterním svalu.

Význam AMPK v játrech a kosterním svalu v akutním účinku metforminu

Metformin je považován za aktivátor AMPK (Zhou *et al.*, 2001). n-3 PUFA aktivují AMPK v játrech (Suchankova *et al.*, 2005) a jeden z mechanismů, kterým by mohly n-3 PUFA posilovat účinek metforminu je vliv na AMPK. V játrech jsou exprimovány obě izoformy podjednotky α . Podjednotka α 2 v játrech je zodpovědná za snížení jaterní produkce glukózy a udržování glykémie nalačno (Jelenik *et al.*, 2010), zatímco α 1 podjednotka se zřejmě na udržování glukózové homeostázy nepodílí (Viollet *et al.*, 2003). Metformin nezvýšil aktivitu α 1 ani α 2 podjednotky jaterní AMPK 1 hodinu po jeho podání.

Aktivita jaterní AMPK *in vitro* v potkaních hepatocytech se signifikantně zvyšuje až po 3 hodinách inkubace s různými dávkami metforminu (Stephenne *et al.*, 2011), *in vivo* dochází k nástupu účinku později, aktivace jaterní AMPK tak pravděpodobně není zahrnuta v mechanismu časného účinku metforminu. Ani dieta HFD+F signifikantně nezvýšila aktivitu katalytických podjednotek AMPK. Toto se neshoduje s výsledky jiného experimentu (Suchankova *et al.*, 2005), kde byla pozorována aktivace AMPK po 7 dnech podávání diety bohaté na n-3 PUFA v porovnání s kontrolní skupinou. V této publikaci byla naměřená aktivita AMPK nalačno podobná mezi oběma skupinami. Po podání potravy se aktivita AMPK snížila, ale u skupiny krmené n-3 PUFA bylo toto snížení signifikantně menší (Suchankova *et al.*, 2011). Tento rozdíl mohl být zapříčiněn použitím jiného zvířecího modelu, a to potkana a diety, kdy byla podávána dieta s vysokým obsahem n-3 PUFA.

Ani v kosterním svalu jsme neprokázali zvýšení aktivity AMPK vlivem metforminu. To je v souladu s výsledky článku z roku 2006, kde po jednorázové aplikaci metforminu došlo k fosforylaci AMPK na Thr¹⁷² v kosterním svalu *in vivo* až po 5-6 hodinách (Suwa *et al.*, 2006). Mechanismus, kterým metformin takto významně snižuje glykémii už v raných fázích jeho působení tak pravděpodobně nezahrnuje aktivaci AMPK v játrech a kosterním svalu.

Vliv jednorázového podání metforminu na sekreci inzulínu

Po podání glukózy dochází k nárůstu její hladiny v krvi. Na zvýšení glykémie reagují β buňky pankreatu zvýšením sekrece inzulínu. Inzulín stimuluje vstup glukózy do buněk a dochází ke snížení její hladiny v krvi. U zdravého jedince tak po podání glukózy nedochází k tak velkým vzestupům glykémie jako u inzulín-rezistentního (Rhodes a White, 2002). Pro objasnění mechanismu, jakým metformin snižuje glykémii v průběhu zlepšuje glukózovou toleranci, byly změřeny hladiny inzulínu v plazmě nalačno a ve 30. minutě GTT po podání vysoké dávky metforminu (400 mg/kg). Hladina inzulínu se zvýšila u všech skupin jako odpověď na aplikaci glukózy, avšak nebyly nalezeny rozdíly mezi skupinami, kterým byl nebo nebyl podán metformin. Projevil se pouze trend, dle kterého dieta HFD+F

mírně zvýšila sekreci inzulínu v porovnání se skupinou HFD. To je v souladu s výsledky experimentu, kde byl metformin podáván dlouhodobě a také nedošlo ke zvýšení sekrece inzulínu. Naopak hladina inzulínu na lačno a i hladiny inzulínu po podání glukózy byly vždy snižené v porovnání s kontrolní skupinou HFD (Matsui *et al.*, 2010). Ukázalo se tak, že za akutní účinek metforminu na glykémii během GTT není zodpovědná zvýšená sekrece inzulínu, ale jiný mechanismus.

Podání metforminu akutně zvyšuje hladiny GLP-1 v porovnání s kontrolní skupinou už 90 minut po aplikaci (Matsui *et al.*, 2010). GLP-1 je sekretován střevem při průchodu potravy a jeho výlev je stimulován i glukózou. GLP-1 zvyšuje sekreci inzulínu, inhibuje sekreci glukagonu a zvyšuje inzulínovou citlivost (Tolhurst *et al.*, 2009). Ve stavu zhoršené inzulínové citlivosti je sekrece glukagonu zvýšená a stimuluje glukoneogenezi v játrech (Miller *et al.*, 2013). Je možné, že podání metforminu a následně bolusu glukózy per orálně stimulovalo sekreci GLP-1, který poté prostřednictvím inhibice sekrece glukagonu zlepšil odpověď organismu na dávku glukózy.

Časný účinek metforminu na inzulínovou citlivost

Vzhledem k tomu, že časný účinek metforminu a jeho kombinace s n-3 PUFA na glukózovou citlivost není zprostředkován zvýšením sekrece inzulínu ani aktivací AMPK, byla testována hypotéza, že metformin zlepšuje glukózovou toleranci prostřednictvím zvýšení citlivosti tkání k inzulínu. Proto byla stanovena aktivace Akt/PKB, která je klíčovým uzlem v signalizaci spouštěné inzulínem a zodpovídá za inzulínovou citlivost. Byla měřena fosforylace Akt/PKB na Thr³⁰⁸, aminokyselině, jejíž fosforylace je klíčová pro přenos inzulínového signálu (Karlsson *et al.*, 2005). V kosterních svalech diabetických pacientů nebyla po dlouhodobé léčbě metforminem zjištěna zvýšená aktivita Akt/PKB (Kim *et al.*, 2002), zatímco v játrech vyvolala 30-ti minutová expozice hepatomových buněk metforminu *in vitro* aktivaci proximálních členů inzulínové signální kaskády, a to IR a IRS (Gunton *et al.*, 2003). Naše výsledky popisující akutní účinek metforminu nebo n-3 PUFA v kosterním svalu a játrech neukazují, že ke zlepšení glukózové tolerance dochází

prostřednictvím zvýšení inzulínové citlivosti aktivací Akt/PKB. Kombinace metforminu s n-3 PUFA také nedokázala zvýšit signalizace Akt/PKB v játrech nebo kosterním svalu.

Protože je metformin nejrozšířenějším preparátem pro léčbu diabetu 2. typu, je třeba mechanismus fungování této látky dále studovat. Zejména akutní účinek metforminu není dostatečně charakterizován, je třeba zjistit, která tkáň odpovídá za toto působení a jaké mechanismy se tohoto procesu účastní. n-3 PUFA vykazují v mnoha ohledech benefiční účinky na metabolismus. V kombinaci s jinými preparáty pro léčbu diabetu 2. typu n-3 PUFA aditivním způsobem zvyšují inzulínovou citlivost kosterního svalu. Je třeba charakterizovat, jakým způsobem by mohly n-3 PUFA zlepšovat účinky metforminu a to zejména na modelech s plně rozvinutou inzulínovou rezistencí.

7. Závěr

1. Byly provedeny tři testy glukózové tolerance s vysokou a nízkou dávkou metforminu na myších, u kterých byla předem indukována obezita vlivem podávání vysokotukové diety. Výsledky testů jasně prokázaly, že metformin významně zlepšuje glukózovou toleranci už 60 minut po podání jedné dávky této látky. Efekt metforminu výrazně závisí na podané dávce.
2. Aditivní efekt kombinace metforminu a krátkodobého podávání diety s n-3 PUFA nebyl prokázán u vysoké ani nízké dávky metforminu v porovnání se skupinami na vysokotukové dietě, kterým byla podána vysoká resp. nízká dávka metforminu.. V experimentech s nízkou dávkou metforminu bylo dosaženo signifikantního zlepšení glukózové tolerance, v porovnání s kontrolní skupinou, pouze u skupiny kombinující účinek metforminu s n-3 PUFA.
3. Testy glukózové tolerance transgenních myší s celotělovým knockoutem $\alpha 2$ podjednotky AMPK, jimž byly podány nízké dávky metforminu, prokázaly, že $\alpha 2$ podjednotka AMPK není nezbytná pro akutní účinek metforminu na glukózovou homeostázu. Měření aktivace AMPK v játrech a kosterním svalu také prokázala, že aktivace AMPK v těchto tkáních není zahrnuta v časném účinku metforminu.
4. Stanovení aktivace Akt/PKB v játrech a kosterním svalu neprokázala významné rozdíly v míře aktivace tohoto enzymu zodpovědného za inzulínovou citlivost.

8. Přehled literatury

- Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC. 2006.** Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* **47**: 366-374.
- Adams JM 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ. 2004.** Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* **53**: 25-31.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Biochim Biophys Acta* **7**: 261-269.
- Alexandre KB, Smit AM, Gray IP, Crowther NJ. 2008.** Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1. *Diabetes Obes Metab.* **10(8)**:688-90
- Argaud D, Roth H, Wiernsperger N. 1993.** Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* **213**:1341-1348
- Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP. 2010.** Standard operating procedures for describing and performing metabolis tests of glucose homeostasis in mice. *Disease models and mechanisms.* **3**:1-10
- Bailey CJ, Day C. 2003.** Metformin: its botanical background. *Pract Diab Int.* **21**:115-117
- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. 2006.** Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* **55**: 2277–2285
- Bosi E. 2009.** Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? *Diabetes Obes Metab.* **11** Suppl 2:3-8.
- Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB. 2006.** Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *J Lipid Res.* **47(1)**:181-92.
- Consitt LA, Bell JA, Hudson JA. 2009.** Intramuscular lipid metabolism, insulin action and obesity. *IUBMB Life* **61**: 47-55.
- Corpeleijn E, Saris WH, Blaak EE. 2009.** Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev.* **10(2)**:178-93.
- Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. 1996.** Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* **81**: 4059-4067
- Davidson MH. 2006.** Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* **98(4A)**: 2733.

- De Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. 2004.** Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK dependent manner. *J Biol Chem* **279**: 17070-17078.
- DeFronzo RA , Tripathy D. 2009.** Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. **32**(Suppl 2): S157–S163.
- Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J 3rd, Montminy M. 2008.** Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*. **319**:1405-1405
- Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. 2012.** Omega-3 fatty acids for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. **18**(41):5839–5847
- Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM. 2005.** Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **332**:892–896
- Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR. 1996.** Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology*. **137**:113-121
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ. 2000.** Longchain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: 554-560.
- El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. 2000.** Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. **275**: 223-228
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. 2005.** Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. **330**:1304-1305
- Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, Reichard G Jr, Bevilacqua S, Barrett EJ, Olsson M, DeFronzo RA. 1988.** The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*. **37**(1):79-85.
- Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O. et al. 2006.** Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed high-fat diet. *Diabetologia* **49**:394-397
- Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. 2009.** Cellular and molecular effects of n-3 fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci*. **116**:1-16.
- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P. et al. 2005.** Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* **48**:2365-2375

- Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferré P, Foulle F. 1998.** AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **273**(24):14767-71.
- Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. 2010.** Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* **120**:2355-2369
- Frayn KN. 2002.** Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**: 1201–1210,
- Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, Dagogo-Jack S, Davidson MB, Einhorn D, Garvey WT, Grunberger G, Handelsman Y, Hirsch IB, Jellinger PS, McGill JB, Mechanick JI, Rosenblit PD, Umpierrez G, Davidson MH. 2013.** AACE comprehensive diabetes management algorithm 2013. *Endocr Pract.* **19**(2):327-36
- González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. 2009.** Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*, **23**(6):1946–1957.
- Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T. 2008.** Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **294**:G1281-1287
- Green, A., Dobias, S.B., Walters, D.J. & Brasier, A.R. 1994.** Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology* **134**:2581-2588 .
- Grisouard J, Timper K, Radimerski TM, Frey DM, Peterli R, Kola B, Korbonits M, Herrmann P, Krähenbühl S, Zulewski H, Keller U, Müller B, Christ-Crain M. 2010.** Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes. *Biochem Pharmacol.* **80**(11):1736-45.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. 2005.** Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**: 99-109
- Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. 2003.** Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**:1323-1332
- Hamann A, Matthaei S. 1996.** Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **104**(4): 293–300.
- Haslam DW, James WP. 2005.** Obesity. *Lancet.* **366**(9492):1197-209
- Haystead, T.A. & Hardie, D.G. 1986.** Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-CoA carboxylase activity in isolated adipocytes. Importance of homogenization procedure in avoiding artefacts in acetyl-CoA carboxylase assay. *Biochem. J* **234**:279-284.

- He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, Radovick S, Wondisford FE. 2009.** Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. **137**(4):635-46
- Henin N, Vincent MF, Gruber HE, Van den Berghe G. 1995.** Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* **9**: 541-546
- Hensler M, Bardova K, Jilkova ZM, Wahli W, Meztger D, Chambon P, Kopecky J, Flachs P. 2011.** The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. *Lipids Health Dis*. **10**:128.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. 2007.** Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* **5**: 167-179.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. 1995.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. **95**(5):2409-15.
- Hotamisligil GS, Shargill NS a Spiegelman BM. 1993.** Adipose expression of tumour necrosis factor- α , direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. **259**:87-91
- Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, Kemp BE, McConell GK. 2003.** Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*. **52**(9):2205-12.
- Choi SH, Ginsberg HN. 2011.** Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. **22**:353-363
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. 1998.** Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**: 1069-1077.
- Itani SI, Pories WJ, Macdonald KG, Dohm GL. 2001.** Increased protein kinase C θ in skeletal muscle of diabetic patients. *Metabolism* **50**: 553-557.
- Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N. 2003.** Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**:1655-1663
- Jelenik T, Rossmeisl M, Kuda O, Jilkova ZM, Medrikova D, Kus V, Hensler M, Janovska P, Miksik I, Baranowski M, Gorski J, Hébrard S, Jensen TE, Flachs P, Hawley S, Viollet B, Kopecky J. 2010.** AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetes*. **59**(11):2737-46.
- Jilkova ZM, Hensler M, Medrikova D, Janovska P, Horakova O, Rossmeisl M, Flachs P, Sell H, Eckel J, Kopecky J. 2013.** Adipose tissue-related proteins locally associated with resolution of inflammation in obese mice. *Int J Obes*. 1-8

Jo J, Guo J, Liu T, Mullen S, Hall KD, Cushman SW, Periwé V. 2010. Hypertrophy-driven adipocyte death overwhelms recruitment under prolonged weight gain. *Biophys J*. **99**(11):3535-44.

Kagawa Y, Nishizawa M, Suzuki M, Miyatake T, Hamamoto T, Goto K, et al. 1982. Eicosapolyenoic acids of serum lipids of Japanese islanders with low incidence of cardiovascular diseases. *J Nutr Sci Vitaminol*. **28**:441–453.

Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H. 2005. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. **54**(6):1692-7.

Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**: 2944-2950.

Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. 2000. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: 1039-1044.

Kim YB, Ciaraldi TP, Kong A, Kim D, Chu N, Mohideen P, Mudaliar S, Henry RR, Kahn BB. 2002. Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110 β protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. **51**(2):443-8

Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, Jang WG, Cho WJ, Ha J, Lee IK, Lee CH, Choi HS. 2008. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*. **57**(2):306-14

Kissebah AH, Vydelingum N, Murray M, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW, 1982. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. **54**: 254-260

Kuda O, Stankova B, Tvrzicka E, Hensler M, Jelenik T, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. 2009. Prominent role of liver in elevated plasma palmitoleate levels in response to rosiglitazone in mice fed high-fat diet. *J Physiol Pharmacol*. **60**(4):135-40.

Kumar N, Dey CS. 2002. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol*. **137**:329-36.

Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 1999. 5'-AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* **48**: 1667–1671.

Lam YY, Hatzinikolas G, Weir JM, Janovská A, McAinch AJ, Game P, Meikle PJ, Wittert GA. 2011. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. **1811**: 468-475.

Lawlor MA, Alessi DR. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**: 2903-2910.

- Lee JO, Lee KS, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, Kim SJ, Park SH, Kim HS. 2012.** Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *J Biol Chem.* **287(53):** 44121–44129.
- Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, Park SH, Uhm KO, Kim HS. 2011.** Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* **226(4):**974-81
- Lenhard JM, Kliewer SA, Paulik MA, Plunket KD, Lehmann JM, Weiel JE. 1997.** Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism: alterations of two distinct molecular pathways. *Biochem Pharmacol.* **54(7):**801-8.
- Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. 2011.** AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13(4):**376-88.
- Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. 2000.** Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med.* **6(9):**998-1003.
- Lombardo YB, Hein G, Chicco A. 2007.** Metabolic syndrome: Effects on n-3 PUFA on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids.* **42:**427-437
- Lombardo YB, Chicco A. 2006.** Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dislipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *Journal of nutritional biochemistry.* **17:**1-13
- Lorente-Cebrián S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. 2009.** Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clin Sci.* **117(6):**243-9.
- Luna V, Casauban L, Sajan MP, Gomez-Daspert J, Powe JL, Miura A, Rivas J, Standaert ML, Farese RV. 2006.** Metformin improves atypical protein kinase C activation by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO₄)₃ in muscle of diabetic subjects. *Diabetologia.* **49(2):**375-82.
- Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. 2005.** Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1740:** 266-286
- Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. 2011.** Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia.* **54(2):**339-49.
- Mannucci E, Tesi F, Bardini G, Ognibene A, Petracca MG, Ciani S, Pezzatini A, Brogi M, Dicembrini I, Cremasco F, Messeri G, Rotella CM. 2004.** Effects of metformin on glucagon-like peptide-1 levels in obese patients with and without Type 2 diabetes. *Diabetes Nutr Metab.* **17(6):**336-42.
- Martín de Santa Olalla L, Sánchez Muniz FJ, Vaquero MP. 2009.** N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp.* **24:** 113-127

- Matsui Y, Hirasawa Y, Sugiura T, Toyoshi T, Kyuki K, Ito M. 2010.** Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Biol Pharm Bull.* **33**:963-970
- Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. 2008.** Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* **57**(8):1071-7.
- McGarry JD, Brown NF. 1997.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem* **244**: 1-14
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. 2013.** Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* **494**:256-260
- Montague CT, O'Rahilly S. 2000.** The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes.* **49**(6):883-8.
- Mostad IL, Bjerve KS, Bjorgaas MR, Lydersen S, Grill V. 2006.** Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. *Am J Clin Nutr.* **84**: 540-550.
- Motawi TM, Hashem RM, Rashed LA, El-Razek SM. 2009.** Comparative study between the effect of the peroxisome proliferator activated receptor-alpha ligands fenofibrate and n-3 polyunsaturated fatty acids on activation of 5'-AMP-activated protein kinase-alpha1 in high-fat fed rats. *J Pharm Pharmacol.* **61**(10):1339-46.
- Mullen A, Loscher CE, Roche HM. 2010.** Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *J Nutr Biochem.* **21**(5):444-50.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenhol mP, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. 2002.** Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* **51**:2074-2081.
- Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. 2004.** Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004. **20**(1):23-8.
- Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H. 2009.** Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* **284**:14809-14818
- Nuernberg K, Breier BH, Jayasinghe SN, Bergmann H, Thompson N, Nuernberg G, Dannenberger D, Schneider F, Renne U, Langhammer M, Huber K. 2011.** Metabolic responses to high-fat diets rich in n-3 or n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in mice selected for either high body weight or leanness explain different health outcomes. *Nutr Metab (Lond).* **8**(1):56.

Ogden CL, Carroll MD. 2010. Prevalence of overweight, obesity, and extreme obesity among adults: United States, Trends 1960–1962 through 2007–2008. Centers for disease control and prevention. [http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_adult_07_08/obesity_adult_07_08.pdf]; [cit. 30.3. 2014]

Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. 2011. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem.* **286**(1):1-11.

Owen M, Doran E, Halestrap A. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* **348**:607-614

Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB. 2003. The role of liver X receptor alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem*; **278**: 40736–43.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**: 664-671.

Poudyal H, Brown L. 2011. Stearoyl-CoA desaturase: a vital checkpoint in the development and progression of obesity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **11**: 217-231.

Pryor PR, Liu SC, Clark AE, Yang J, Holman GD, Tosh D. 2000. Chronic insulin effects on insulin signalling and GLUT4 endocytosis are reversed by metformin. *Biochem J.* **348 Pt 1**:83-91.

Rhodes C, White MF. 2002. Molecular insights into insulin action and secretion. *European Journal of Clinical Investigation.* **32** (Suppl. 3): 3 – 13

Risérus U, Willett WC, Hu FB. 2009. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res.* **48**(1): 44–51.

Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T et al. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**:1177-1185

Sajan MP, Ivey RA, Farese RV. 2013. Metformin action in human hepatocytes: coactivation of atypical protein kinase C alters AMP-activated protein kinase effects on lipogenic and gluconeogenic enzyme expression. *Diabetologia.* **56**:2507-2516

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. 1996. The expression of TNF-alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* **97**: 1111-1116

Sampath H, Ntambi JM. 2005. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* **25**:317–40.

Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI. 2007. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* **117**:739–745.

Samuel VT, Shulman GI. 2012. Mechanisms of insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* **148**:852-871

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* **87**:507-520

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* **310**:1642-1646

Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(9):4637-41.

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. 1999. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem.* **274**:30028-30032

Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, Sheardown SA, Yue L, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. 2007. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT 1) on metformin action. *J Clin Invest.* **117**: 1422-1431

Shulman GI. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**: 171–176,

Simoneau JA, VeerkJH, Turcotte LP, Kelley DE. 1999. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* **13**: 2051-2060.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Fletcher S, Xin W, Claycombe KJ, Quignard-Boulange A, Zhao L, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. 2012. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- κ B-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem.* **23**(12):1661-7.

Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B. 2011. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* **54**:3101-3110

Stephens TJ, Chen ZP, Canny BJ, Michell BJ, Kemp BE, McConell GK. 2002. Progressive increase in human skeletal muscle AMPK α 2 activity and ACC phosphorylation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**(3):E688-94

Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S, Müller M. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor α protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology.* **148**(6):2753-63.

Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. 1987. Fish oil prevents insulin resistance induced by high fat feeding in rats. *Sciences.* **237**: 885-888

Strålfors, P. & Honnor, R.C. 1989. Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur. J. Biochem* **182**:379-385.

- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005.** Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. **365**:1333-1346
- Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. 2005.** Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **326**:851–858
- Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. 2006.** Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol*. **101**: 1685-1692
- Takamura T, Misu H, Matsuzawa- Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A. 2008.** Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetes patients. *Obesity*. **16**:2601-2609
- Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. 2010.** Insulin-sensitizing drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhea and subfertility. *Cochrane Database Sys Rev*. CD003053
- Tishinsky JM, Gulli RA, Mullen KL, Dyck DJ, Robinson LE. 2012.** Fish oil prevents high-saturated fat diet-induced impairments in adiponectin and insulin response in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**: 598-605.
- Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhäusl W, Stulnig TM. 2006.** Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*. **49(9)**:2109-19.
- Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. 2009.** Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol*. **587**:27-32
- Turban S, Stretton C, Drouin O, Green J, Watson M, Gray A, Ross F, Lantier L, Viollet B, Hardie DG, Marette A, Hundal HS. 2012.** Defining the contribution of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase C (PKC) in regulation of glucose uptake by metformin in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. **287**: 20088-20099
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 1998.** Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS34) *Lancet*. **352**:854-865
- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.** Evropské výběrové šetření o zdravotním stavu v ČR - EHIS CR (Index tělesné hmotnosti, fyzická aktivita, spotřeba ovoce a zeleniny) PDF [<http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/vyberova-setreni-studie/ehis-cr-2008>]; [cit. 30.3.2014]
- Vague J. 1956.** The degree of masculine differentiation of obesities, a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr*. **4**:20-34
- Viollet B, Guigas B, Leclerc J. 2009.** AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*.; **196**: 81-98

Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S. 2003. The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest.* **111**(1):91-8.

Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E, Burcelin R, Vaulont S. 2003. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans.* **31**(Pt 1):216-9.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* **112**(12):1796-808.

Wellen KE, Hotamisligil GS, 2005. Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* **115**:1111-1119

Whitlock G, Lewington S, Sherliker P et al. 2009. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* **373**(9669): 1083–96.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S. et al. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**:1288-95.

Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Silljé HH, de Boer RA. 2011. Metformin improves cardiac function in a non-diabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **301**(2):H459-68.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. 2002. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**: 50230-50236.

Yuan L, Ziegler R, Hamann A. 2003. Metformin modulates insulin post-receptor signaling transduction in chronically insulin-treated Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin.* **24**(1):55-60.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. 2004. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem.* **279**(46):47898-905

Zhang L, Wheatley CM, Richards SM, Barrett EJ, Clark MG, Rattigan S. 2003. TNF- α acutely inhibits vascular effects of physiological but not high insulin or contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **285**: 654-660.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* **108**(8):1167-74.